

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 8 月 23 日 (23.08.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 01/61351 A1

- (51) 国際特許分類: G01N 33/533, 33/561, 33/563  
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/00903  
(22) 国際出願日: 2000 年 2 月 17 日 (17.02.2000)  
(25) 国際出願の言語: 日本語  
(26) 国際公開の言語: 日本語  
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所 (LABORATORY OF MOLECULAR BIOPHOTONICS) [JP/JP]; 〒434-8555 静岡県浜北市平口5000番地 Shizuoka (JP).  
(72) 発明者; および  
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 久田 素 (HISADA, Sunao) [JP/JP]. 伊藤由紀子 (ITO, Yukiko) [JP/JP]. 松本浩幸 (MATSUMOTO, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒434-8555 静岡県浜北市平口5000番地 株式会社 分子バイオフォトニクス研究所内 Shizuoka (JP). 志村清仁 (SHIMURA, Kiyohito) [JP/JP]; 〒220-0208 神奈川県津久井郡津久井町又野297-6 Kanagawa (JP). 笠井献一 (KASAI, Kenichi) [JP/JP]; 〒220-0112 神奈川県津久井郡城山町若葉台1-3-12 Kanagawa (JP).  
(74) 代理人: 弁理士 長谷川芳樹, 外 (HASEGAWA, Yoshiki et al.); 〒104-0061 東京都中央区銀座二丁目6番12号 大倉本館 創英国際特許法律事務所 Tokyo (JP).  
(81) 指定国 (国内): JP, US.  
(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  
添付公開書類:  
— 国際調査報告書

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR QUANTITATIVELY DETECTING ANTIGEN

(54) 発明の名称: 抗原の定量的検出方法

(57) Abstract: A method for quantitatively detecting an antigen which involves: the first step of providing an isoelectrically homogenized Fab' antibody having an amino acid sequence containing a charged amino acid residue added thereto, being labeled with a fluorescent chromophore and being capable of forming an immunocomplex with an antigen contained in a sample to be analyzed; the second step of mixing this isoelectrically homogenized Fab' antibody with the sample containing the above-mentioned antigen to thereby give a mixture containing the above-mentioned immunocomplex; the third step of electrophoresing this mixture in a carrier to thereby separate the mixture; the fourth step of irradiating the mixture separated in the third step with light capable of exciting the above-mentioned fluorescent chromosome to thereby make the immunocomplex to fluoresce; and the fifth step of detecting this fluorescence.

(57) 要約:

荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発蛍光団色素で標識されており、且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形成する等電点均一化 F a b' 抗体を提供する第 1 の工程と、前記等電点均一化 F a b' 抗体と、前記抗原を含む前記分析用試料とを混合し、前記免疫複合体を含む混合物を得る第 2 の工程と、前記混合物を担体中で電気泳動させ、前記混合物を分離させる第 3 の工程と、前記第 3 の工程で分離された前記混合物に、前記発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、前記免疫複合体に蛍光を生じせしめる第 4 の工程と、前記蛍光を検出する第 5 の工程とを含む、抗原の定量的検出方法。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

## 明細書

### 抗原の定量的検出方法

#### 技術分野

- 5       本発明は抗原の定量的検出方法に関し、より詳しくは、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発蛍光団色素で標識されており、且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形成する等電点均一化 F a b' 抗体を用いた抗原の定量的検出方法に関する。

#### 10       背景技術

- 電荷を有する物質を電解質溶液に浮遊させて電圧を印加すると、物質の電荷とは逆の電極へ向かって物質が移動するという電気泳動の現象は、様々な物質の分離の手段として広く利用されている。一般的な電気泳動は、一定 p H の泳動用担体中で分析試料の泳動を行うものであるが、泳動担体に p H 勾配を持たせその担体中で試料の電気泳動を行うという等電点電気泳動法が開発されて以来、アミノ酸やタンパク質などの両性電解質の分離の手段としてその用途が拡大してきている。

- 15       両性電解質は、等電点と呼ばれる、実効電荷がゼロとなるような p H 値を有する。等電点電気泳動法により両性電解質試料の電気泳動を行うと、試料がある一定の位置に濃縮されて静止するが、その位置は、泳動用担体中の p H が試料の等電点と等しくなっている点である。その際、試料は焦点的に濃縮されて分離されるので、等電点電気泳動法は非常に高い分離能を有している。

- 20       また、近年、電気泳動を内径が数十  $\mu$  m、長さが数百 m m 程度の毛細管（キャピラリー）の中で行なうキャピラリー電気泳動法が考案され、微量な分析試料でも高い分離能を有することから、タンパク質のみならず、無機イオン、低分子化合物、核酸等の分離・分析に応用されている。キャピラリー電気泳動を行う際に

、キャピラリーの一端に検出器を装着し分離されてきた試料成分を検出することにより、濃度を定量化する試みもなされている。

電気泳動により分離された試料の検出は、試料に紫外光あるいは可視光を照射し吸収される光量の変化を測定する紫外可視検出法が一般的であるが、さらに高感度な検出方法として、あらかじめ分析試料を発蛍光団色素で標識（蛍光標識）し分離された試料成分に、励起光を照射して蛍光を発生させることで濃度を定量化する蛍光検出法がある。

上記の等電点電気泳動法とキャピラリー電気泳動法を組み合わせ、さらに検出を蛍光検出法で行うことも可能である（蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動法）。すなわち、pH勾配を有した泳動担体に含まれる蛍光標識された試料をキャピラリー中で電気泳動させ、励起光を照射して生じる蛍光を光検出器等で検出する。この方法によれば、微量の試料であっても高精度の定量的検出が可能であるため、タンパク質等の超高感度分析方法として注目されている。

近年、生体内の微量成分を上記のような電気泳動法の分析の対象物とする場合が増加している。このような分析を行う場合は、生体内の微量成分と、該微量成分を抗原として認識する抗体とを結合させ免疫複合体を形成させて、該免疫複合体を検出することが行われる。高精度の検出のためには免疫複合体が蛍光標識されていることが好ましい。このとき、抗原もしくは抗体のいずれかが蛍光標識されている必要があるが、抗原もしくは抗体を一般的な標識方法により蛍光標識することは以下に述べる理由により好ましくない。

すなわち、抗原の多くと抗体はタンパク質からなっており、タンパク質のN末端のアミノ基およびリシン側鎖のアミノ基の数とその解離状態は、タンパク質の等電点を決める大きな要因となるので（統生化学実験講座2、タンパク質の化学—上、日本生化学会、1987）、アミノ基を利用して発蛍光団色素を化学結合させる一般的な標識方法によれば、タンパク質自身の等電点が大きく変化してしまう。

また、タンパク質には蛍光標識物質と反応可能なアミノ酸が多く存在するため、結合する蛍光標識物質の数と位置が不特定となり、結果として、一つのタンパク質であるにもかかわらず複数の等電点を示す混合物となってしまう。このため、等電点電気泳動で正確な分析をすることが困難となる。さらに、発蛍光団色素

5 による標識のためタンパク質の3次構造が変化するために、タンパク質自身の化学的安定性が悪くなるという問題もある。

検出に用いる抗体として、ハイブリドーマにより産出させて得られた、分子量が均一なモノクローナル抗体を用いた場合でも等電点電気泳動法で正確な分析ができない場合がある。これは、ハイブリドーマ産出の分子量が均一なモノクローナル抗体であっても、等電点が必ずしも均一とならないmicroheterogeneityと呼ばれる現象が生じるからである (Bouman H et al. Z Immunitätsforsch Exp

10 Klin Immunol. 1975 Oct; 150(4): 370-7)。

このような等電点不均一の原因としては、タンパク質の脱アミド化 (Robinson ABら, Proc Natl Acad Sci U S A. 1970 Jul;66(3):753-7)、N末端のピログルタミル化 (Stott DIら, Biochem J 1972 Aug;128(5):1221-7)、糖鎖の付加 (Cohenford MAら, Immunol Commun 1983;12(2):189-200)、ミリスチル化 (Pillai Sら, Proc Natl Acad Sci U S A 1987 Nov;84(21):7654-8) 等が提唱されているが、タンパク質の等電点不均一性のメカニズムは、未だ特定されていない。

15

したがって、等電点電気泳動を行った結果、試料が複数の等電点を有することが判明したとしても、それが抗原に起因するのか抗体に起因するのかわからないことがある。これは、上述のように、抗原および抗体の両者とも等電点の不均一性を有する可能性があるからである。

20

上記のことから、抗原抗体反応を利用して電気泳動法により分析を行う場合は、少なくとも抗体は等電点的に均一である必要があり、等電点が均一な抗体を発

25 蛍光団色素で標識する場合は、上述のようなアミノ基を利用した蛍光標識方法は

好ましくないといふことができる。

等電点が均一な抗体を用いて抗原を定量的に検出する方法としては、Shimura Kおよび Karger BLの方法が知られている (Anal Chem 1994 Jan 1;66(1): 9-15、または特表平 8-506182 号公報参照)。これらの文献に開示の方法を模式的に示すと図 8 A~G のようになる。すなわち、ハイブリドーマ産出の Ig G 抗体 (図 8 A) をタンパク質分解酵素 (ペプシン) により切断し、得られた F (a b')<sub>2</sub> 抗体 (図 8 B) を分離する。これをメルカプトエチルアミン等の還元剤で処理して 3 つの連結ジスルフィド結合 (S-S 結合) を還元し、F a b' 抗体を得る (図 8 C)。この F a b' 抗体を酸化して反応性チオール基 (SH 基) を 1 つだけ残すようにして (図 8 D)、このチオール基に発蛍光団色素を結合させる (図 8 E)。得られた蛍光標識 F a b' 抗体を用いて等電点電気泳動を行い、等電点が均一な蛍光標識 F a b' 抗体を泳動担体から取り出す (図 8 F)。取り出した等電点が均一な蛍光標識 F a b' 抗体を抗原と結合させ電気泳動を行い励起光で生じた蛍光を測定する (図 8 G)。

#### 発明の開示

しかしながら、上記の Shimura K および Karger BL の文献に開示の方法により等電点電気泳動を行う場合においては、等電点が均一な F a b' 抗体を得るまでの工程が煩雑であることに加えて、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合、電気泳動の結果、抗原と抗体からなる免疫複合体と、余剰の抗原および／または抗体がほぼ等しい移動時間で検出されるために、ピークが重なってしまい精度の高い検出ができないという問題点がある。

本発明は上記の従来技術の問題点を鑑みてなされたものであり、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合であっても、高精度で抗原を分析することが可能な、抗原の定量的検出方法を提供することを目的とする。

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体を用いることにより、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合であっても、高精度で抗原を分析することが可能であることを見出し、本発明を完成させた。

- 5       すなわち、本発明は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発  
蛍光団色素で標識されており、且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形  
成する等電点均一化F a b' 抗体を提供する第1の工程と、前記等電点均一化F  
a b' 抗体と、前記抗原を含む前記分析用試料とを混合し、前記免疫複合体を含  
む混合物を得る第2の工程と、前記混合物を担体中で電気泳動させ、前記混合物  
10       を分離させる第3の工程と、前記第3の工程で分離された前記混合物に、前記発  
蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、前記免疫複合体に蛍光を生じせしめ  
る第4の工程と、前記蛍光を検出する第5の工程とを含む抗原の定量的検出方法  
を提供するものである。

- 15       本発明の抗原の定量的検出方法においては、前記アミノ酸配列が、前記等電点  
均一化F a b' 抗体のL鎖のC末端に隣接するように付加されていることが好ま  
しく、前記発蛍光団色素が、前記等電点均一化F a b' 抗体のCH1領域のC末  
端に隣接するアミノ酸配列におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に  
結合していることが好ましい。

- 20       本発明の抗原の定量的検出方法においては、前記電気泳動が、等電点電気泳動  
法により実施されることが好ましく、また、前記電気泳動が、キャピラリー電気  
泳動法により実施されることが好ましい。

- 25       また、前記等電点均一化F a b' 抗体が、F a b' 抗体のVH領域、CH1領  
域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン  
残基を含むアミノ酸配列をコードするFd鎖遺伝子を提供する第1の工程と、前  
記Fd鎖遺伝子において、前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコード  
するコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基

をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変F d鎖遺伝子を得る第2の工程と、前記改変F d鎖遺伝子と、前記F a b' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る第3の工程と、前記改変F a b' 抗体発現遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性  
5 アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る第4の工程と、前記荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含む  
10 アミノ酸配列が形成された、等電点均一化F a b' 抗体を得る第5の工程と、前記第5の工程で得られた等電点均一化F a b' 抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第6の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

さらに、前記等電点均一化F a b' 抗体が、F a b' 抗体のVH領域、CH1  
15 領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするF d鎖遺伝子を提供する第1の工程と、前記F d鎖遺伝子において、前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変F d鎖遺伝子を得る第2の  
20 工程と、前記F a b' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子を提供する第3の工程と、前記L鎖遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与L鎖遺伝子を得る第4の工程と、前記改変F d鎖遺伝子と、前記荷電性付与L鎖遺伝子が発現可能な状態で連結させ、荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る第5の工程と、前記荷電  
25 性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むア



ミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る第6の工程と、前記第6の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第7の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

また、前記等電点均一化Fab'抗体が、Fab'抗体のVH領域、CH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするFd鎖遺伝子と、該Fab'抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子とを提供する第1の工程と、前記Fd鎖遺伝子と前記L鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、Fab'抗体発現遺伝子を得る第2の工程と、前記Fab'抗体発現遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、且つ、前記Fab'抗体発現遺伝子における前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第3の工程と、前記荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る第4の工程と、前記第4の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第5の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

さらに、前記等電点均一化Fab'抗体が、第1のFab'抗体のCH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするCH1遺伝子と、該第1のFab'抗体のC

L領域をコードするCL遺伝子とを提供する第1の工程と、前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変CH1遺伝子を得る第2の工程と、前記改変CH1

5 遺伝子を制限酵素で切断しCH1領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る第3の工程と、第2のFab'抗体のVH領域をコードするVH遺伝子と、該第2のFab'抗体のVL領域をコードするVL遺伝子を提供する第4の工程と、前記遺伝子断片、前記CL遺伝子、前記VH遺伝子および前記VL遺伝子を発現可能な状態で連結し、改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第5の工程と、前記

10 改変Fab'抗体発現遺伝子を、前記CL領域のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第6の工程と、前記荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1

15 領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る第7の工程と、前記第7の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第8の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。

20 加えて、前記等電点均一化Fab'抗体が、第1のFab'抗体のCH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするCH1遺伝子と、該第1のFab'抗体のCL領域をコードするCL遺伝子とを提供する第1の工程と、前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに

25 部位特異的変異させて、改変CH1遺伝子を得る第2の工程と、前記改変CH1

遺伝子を制限酵素で切断しCH1領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る第3の工程と、前記CL遺伝子を、前記CL領域のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与CL遺伝子を得る第4の工程と、第2のFab'抗体のVH領域をコードするVH遺伝子と、  
5 該第2のFab'抗体のVL領域をコードするVL遺伝子を提供する第5の工程と、前記遺伝子断片、前記荷電性付与CL遺伝子、前記VH遺伝子および前記VL遺伝子が発現可能な状態で連結し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第6の工程と、前記荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る第7の工程と、前記第7の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に蛍光団色素を結合させる第8の工程とを含む方法により製造されたものであることが好ましい。  
10  
15

#### 図面の簡単な説明

図1は、ヒトのIgG1抗体を示す模式的に示す図である。

図2Aは、等電点均一化Fab'抗体発現遺伝子の構成図である。

20 図2Bは、等電点均一化Fab'抗体発現遺伝子が導入されたpCANTAB5Eプラスミドベクターを示す図である。

図3は、改変を行っていない抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体を用いて蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動を行った際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

25 図4は、改変を行った抗ヒトアルファ1アンチトリプシンFab'抗体(H-N162D改変Fab'抗体)を用いて蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動

を行った際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

図5は、等電点均一化F a b' 抗体と抗原の免疫複合体を電気泳動で分離した際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

5 図6は、荷電性のアミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された等電点均一化F a b' 抗体と抗原の免疫複合体を電気泳動で分離した際の移動時間と蛍光強度を示す図である。

図7 Aは、等電点均一化F a b' 抗体を発現する遺伝子を組み込んだ大腸菌を模式的に示す図である。

10 図7 Bは、IPTGによる抗体誘導により生じた等電点均一化F a b' 抗体を模式的に示す図である。

図7 Cは、蛍光標識された等電点均一化F a b' 抗体を模式的に示す図である。

15 図7 Dは、蛍光標識された等電点均一化F a b' 抗体と抗原の免疫複合体を電気泳動で分離したときに得られる、移動時間と蛍光強度の関係を模式的に示す図である。

図8 Aは、ハイブリドーマ産出のI g G抗体を模式的に示す図である。

図8 Bは、ハイブリドーマ産出のI g G抗体をタンパク質分解酵素により切断して得られたF (a b')<sub>2</sub>抗体を模式的に示す図である。

20 図8 Cは、F (a b')<sub>2</sub>抗体を還元剤で処理してジスルフィド結合を還元して得られたF a b' 抗体を模式的に示す図である。

図8 Dは、酸化により反応性チオール基を1つだけ残したF a b' 抗体を模式的に示す図である。

図8 Eは、蛍光標識されたF a b' 抗体を模式的に示す図である。

25 図8 Fは、蛍光標識されたF a b' 抗体を等電点電気泳動した時に得られる電気泳動像を模式的に示す図である。

図8 Gは、等電点電気泳動して取り出された蛍光標識された等電点均一化F a

b' 抗体と、抗原の免疫複合体を電気泳動で分離したときに得られる、移動時間と蛍光強度の関係を模式的に示す図である。

#### 発明を実施するための最良の形態

5       本発明の抗原の定量的検出方法は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発蛍光団色素で標識されており、且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形成する等電点均一化 F a b' 抗体を提供する第 1 の工程と、前記等電点均一化 F a b' 抗体と、前記抗原を含む前記分析用試料とを混合し、前記免疫複合体を含む混合物を得る第 2 の工程と、前記混合物を担体中で電気泳動させ、  
10       前記混合物を分離させる第 3 の工程と、前記第 3 の工程で分離された前記混合物に、前記発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、前記免疫複合体に蛍光を生じせしめる第 4 の工程と、前記蛍光を検出する第 5 の工程とを含むものである。

15       抗体は、ヒト I g G 1 抗体を例にとると、図 1 の模式図に示すように、L 鎖 (light chain、軽鎖) と呼ばれるポリペプチド鎖 2 本と、H 鎖 (heavy chain、重鎖) と呼ばれるポリペプチド鎖 2 本が、Y 字型の対をなした構造を有しており、F a b' 抗体とは、V H 領域および C H 1 領域からなる F d 鎖 (ヒンジ領域より N 末端側の H 鎖) と、V L 領域および C L 領域とからなる L 鎖とが - S - S - 結合で連結した F a b 部分に、ヒンジ領域またはその一部が付加した抗体の断片を  
20       いう。

      本発明で用いる F a b' 抗体は、抗原の検出のために用いることから、分析用試料に含まれる該抗原と特異的に反応して、免疫複合体を形成するものでなければならない。本発明の定量的検出方法の検出対象である抗原の種類に関しては、抗原抗体反応を生じるものであればよく、特に制限はない。分析用試料に関して  
25       も特に制限はなく、検出対象である抗原を含むものであればよい。

      また、本発明で用いる F a b' 抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配

列が付加されているが、本発明において荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された F a b' 抗体とは、+または-に荷電する荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が、F a b' 抗体の F d 鎖、L 鎖、ヒンジ領域（またはその一部）のいずれかの部位に少なくとも 1 つ付加したものをいう。+に荷電する荷電性アミノ酸としては、アルギニン、リシン等が挙げられ、-に荷電する荷電性アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加される F a b' 抗体の部位は特に制限されないが、F a b' 抗体が抗原と結合する部位は V H 領域および V L 領域に存在しているため、抗原抗体反応になるべく影響を与えないという観点から、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列は、F a b' 抗体の H 鎖または L 鎖の C 末端側に付加されていることが好ましい。なかでも、L 鎖の C 末端に隣接するように付加されていることが好ましい。また、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列のアミノ酸残基の数は 1 以上であればよく特に制限されないが、その数は 1 ~ 5 0 であることが好ましい。また、当該アミノ酸配列中の荷電性アミノ酸残基の数も特に制限されないが、その数は 1 ~ 3 0 であることが好ましい。

F a b' 抗体に、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を付加する方法に関して特に制限はないが、例えば、後述するように、等電点均一化 F a b' 抗体を発現する遺伝子を鋳型として、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を付加するためのプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応（P C R）を行うことにより、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された等電点均一化 F a b' 抗体を発現する遺伝子が得られるので、これにより形質転換された宿主細胞を培養すればよい。また、等電点均一化 F a b' 抗体に別途合成した荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を結合させてもよい。

本発明で用いる F a b' 抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列の付加されていることに加えて、等電点も均一化されている。F a b' 抗体に等電点の均一性を付与する方法については、特に制限はないが、後述するように、F a

b' 抗体のCH1領域におけるアミド基含有アミノ酸（アスパラギンおよび／またはグルタミン）を、システインを除くアミド基非含有アミノ酸に遺伝子工学的に変異させることにより等電点の均一性を付与することが好ましい。

5 本発明で用いるFab'抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、等電点が均一化されているが、これに加え発蛍光団色素により標識されている。発蛍光団色素としては、ローダミン、フルオレセイン、シアニン、インドシアニン、インドカルボシアニン、ピロニン、ルシファーイエロー、キナクリン、スクエア酸、クマリン、フルオロアンセニルマレイミド、アントラセン等を挙げることができる。発蛍光団色素としてはローダミンおよび／またはシアニンを  
10 を用いることが好ましく、ローダミンを用いることがより好ましい。ローダミンは、メタノール中において、556nmに極大吸収（モル吸光係数93,000）を有し、また576nmを極大とする蛍光を発する。ローダミンに関しては、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 5th Edition MOLECULAR PROBES, INC.,1992 を参照することができる。

15 更に、本発明においては、アントラセン、ナフタレン、フェナントレン、キノリン、ピレン、ペリレン等に代表される芳香族複素環式化合物や多環芳香族炭化水素を発蛍光団色素として用いることも可能である。このような発蛍光団色素に関しては、例えば、蛍光リン光分析、西川泰治、平木敬三著、共立出版、1989を参照することができる。

20 上記の発蛍光団色素とFab'抗体とを反応させる場合、発蛍光団色素により標識されるFab'抗体の部位には特に制限はないが、発蛍光団色素はFab'抗体のシステイン残基のSH基に結合することが好ましく、Fab'抗体のCH1領域のC末端に隣接するアミノ酸配列におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基のSH基に結合させることがより好ましい。

25 上記の発蛍光団色素とFab'抗体とを反応させる場合、反応により生じる結合の種類に関しても特に制限はないが、結合は、チオエステル結合、ジチオエス

テル結合、チオエーテル結合からなる群より選ばれる少なくとも1つの結合であることが好ましい。このとき、F a b' 抗体のアミノ酸残基が有するS H基等の官能基に発蛍光団色素を直接反応させてもよいが、発蛍光団色素中の官能基（例えば、ハロゲン化メチル基、活性エステル基、酸塩化物基、酸無水物基、マレイミド基等）に反応性の官能基と、F a b' 抗体のアミノ酸残基が有するS H基等の官能基に反応性の官能基とをそれぞれ少なくとも1個有した多官能化合物を介して結合させてもよい。

本発明においては、第1の工程に続く第2の工程として、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ発蛍光団色素で標識された上記の等電点均一化F a b' 抗体と、上記の抗原を含む分析用試料とを混合し、免疫複合体を含む混合物を得る。

第2の工程において複合体を形成せしめる方法は特に制限されない。例えば、抗原を含む分析用試料を所望の濃度で超純水もしくは緩衝液に溶解した溶液と、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され発蛍光団色素で標識された等電点均一化F a b' 抗体（以下、場合により、荷電性の蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体と呼ぶことがある）を所望の濃度で超純水もしくは緩衝液に溶解した溶液を混合し、低温（4℃程度）～室温（25℃程度）で数分～数十分保持することにより、複合体を形成させることが可能である。抗原と、荷電性の蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体との混合溶液は、さらに電気泳動用の泳動担体に溶解させる。泳動担体は電気泳動の種類によって異なり、例えば、スラブゲル等電点電気泳動を行う場合は、ポリアクリルアミドゲル等が泳動担体として用いられ、キャピラリー等電点電気泳動を行う場合は、Pharmalyte（アマシャム ファルマシアバイオテク社製）等の両性担体が用いられる。なお、キャピラリー等電点電気泳動を行う場合は、電気浸透流やタンパク質の吸着を防ぐために、ヒドロキシプロピルメチルセルロース等をさらに添加してもよい。

第3の工程では、第2の工程で得られた混合物を担体中で電気泳動させ、該混



合物を分離させる。

第3の工程において実施する電気泳動の方法に関しては、特に制限はないが、検出精度が高いことから等電点電気泳動法によることが好ましい。また、免疫複合体が微量しか存在しない場合であっても検出が可能なことから、キャピラリー電気泳動法を用いることが好ましい。また、マイクロセル電気泳動法やチップ電気泳動法を用いることも可能である。本発明においては、微量の免疫複合体を高精度で検出が可能なキャピラリー等電点電気泳動法を用いることがより好ましい。

キャピラリー電気泳動を行う場合のキャピラリーとしては、例えば、ソーダ石灰ガラス等からなり、内径が数～百 $\mu\text{m}$ 程度、外径が数百 $\mu\text{m}$ 程度、長さが数十～百 $\text{cm}$ 程度のものが用いられる。なお、これらの寸法、特に長さは、測定しようとする免疫複合体の種類等によって適宜選択される。

印加する電圧に関しても特に制限はなく、電気泳動の種類、測定しようとする免疫複合体の種類や濃度、泳動担体の形状や長さ、用いる電気泳動装置の種類等により適宜選択が可能である。

第4の工程においては、第3の工程で分離された混合物に、発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、免疫複合体に蛍光を生じせしめる

励起光の種類に関して特に制限はない。発蛍光団色素としてローダミンを用いる場合は、アルゴンレーザー、半導体励起YAGレーザー、ヘリウムネオンレーザー等を好適に用いることができる。

第5の工程では、第4の工程で生じた蛍光を検出する。蛍光を検出する手段としては蛍光検出が可能な光検出器を用いることができる。光検出器としては、例えば、デンシトメータ（例えば、島津製作所製、島津二波長フライングスポットスキャンングデンシトメータCS9300PC）を好適に用いることができる。

光検出器により蛍光強度が測定されるが、用いた発蛍光団色素に関して、濃度－蛍光強度との関係をあらかじめ測定して得られたデータに基づいて、検出した

複合体の濃度を定量化することが可能である。

5 以上説明したように、本発明においては用いられる抗体は、等電点が均一であるため、電気泳動の結果複数のピークが観察された場合は、その複数のピークは抗原の等電点の不均一性に起因するものであると特定することができる。また、  
10 本発明において用いられる抗体は、発蛍光団色素等により蛍光標識されているため高精度の検出が可能である。さらに、本発明において用いられる抗体は、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加されているために、荷電性アミノ酸残基の種類および／または導入量を変化させることにより、等電点の均一性を保ったまま等電点を所望の値に変化させることができるため、測定対象である抗原の  
15 等電点と抗体の等電点が近い場合であっても、電気泳動の結果、免疫複合体と、余剰の抗原および／または抗体がほぼ等しい移動時間で検出されることがなく、精度の高い検出が可能になる。

20 上述したShimura Kおよび Karger BLの方法で用いられるF a b' 抗体も、化学変性することにより電荷を付与し等電点を抗体の等電点と異なるようにすることも不可能ではないが、化学変性のために使用するF a b' 抗体の官能基（例えば、アミノ基）は、抗体中にランダムに分布しているため均一な変性が不可能であり、また、変性によって等電点の均一性が損なわれることも考えられる。したがって、Shimura Kおよび Karger BLの方法では、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合、精度の高い検出をすることが不  
25 可能である。

本発明においては、抗体の定量的検出に用いる荷電性の蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体は、以下に述べる遺伝子工学的手法による第1～第5の製造方法のいずれかにより製造することが好ましい。

25 遺伝子工学的手法による第1の製造方法は、F a b' 抗体のV H領域、C H 1領域、および該C H 1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするF d鎖遺伝子を提供する第1の工程と、

前記F d鎖遺伝子において、前記CH 1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変F d鎖遺伝子を得る第2の工程と、前記改変F d鎖遺伝子と、前記F a b'抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、改変F a b'抗体発現遺伝子を得る第3の工程と、前記改変F a b'抗体発現遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変F a b'抗体発現遺伝子を得る第4の工程と、前記荷電性付与改変F a b'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH 1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化F a b'抗体を得る第5の工程と、前記第5の工程で得られた等電点均一化F a b'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第6の工程とを含む製造方法である。

第1の工程において、F a b'抗体のVH領域、CH 1領域、および該CH 1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするF d鎖遺伝子を提供する方法には特に制限はなく、例えば、以下に述べるような方法により得ることができる。

すなわち、抗原で動物を免疫した後、例えば、Antibodies : A Laboratory Manual, Chapter 6, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N Y, 1988に記載の方法に準じて、モノクローナル抗体生産細胞（ハイブリドーマ）を調製し、このモノクローナル抗体生産細胞から、例えば、BioMag mRNA purification kit (PerSeptive社)のプロトコールに従って全mRNAを抽出して、このmRNAを用いて1本鎖cDNAを合成する（例えば、アマシャム ファルマシアバイオテク社製、cDNA合成システム・プラスを好適に使用すること

ができる)。

次いで、この1本鎖cDNAを鋳型にして、CH1領域のC末端に隣接する部分にL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列を導入するように設計したFd鎖遺伝子単離用のDNAプライマーを用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによりFd鎖遺伝子を得ることができる。このFd鎖遺伝子単離用のDNAプライマーは、例えば、Kabatらの分類した可変領域(V領域)と定常領域(C領域)の核酸塩基配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1991)を参考にすることができる。また、CH1領域のC末端に隣接する部分にL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列を導入するためのプライマーの設計には、Hoogenboom HR et al. (Nucleic Acids Res 1991 Aug 11; 19(15):4133-7), Kang AS et al. (Methods (San Diego) (1991), 2(2), 111 - 18)等の各種文献を参考にすることができる。

CH1領域のC末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数は1以上であればよく特に制限されないが、その数は1~30であることが好ましい。また、当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数も特に制限されないが、その数は1~3であることが好ましく、1であることがより好ましい。

なお、モノクローナル抗体生産細胞を調製するにあたり、動物を免疫する抗原の種類、および抗原で免疫される動物の種類には特に制限はない。抗体遺伝子としては、例えば、マウス、ラット、ウサギ由来のものが使用できる。抗体のクラスおよびサブクラスについても特に制限はないが、全抗体中に占める割合が多いことからIgG抗体を構成する配列を用いることが好ましい。

第2の工程では、前記Fd鎖遺伝子において、前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させるが、この変異の方法については特に制限はない。例えば、遺伝子のヌクレオチド配列の変異法

として多用される部位特異的突然変異誘発 (site-specific mutagenesis) が適用可能である。部位特異的突然変異誘発の方法に関しては、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd Edition, 15.2- 15.113, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参考にすることが5 できる。

上記の部位特異的変異は、CH 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基の少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に置換するように設計されたCH 1 領域増幅用プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により実施されることが好ましい。このCH 1 領域増幅用プライマーは、Fd 鎖のCH 1 領域10 における少なくとも一つのアミド基含有アミノ酸残基を含む領域をコードする塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーであって、該塩基配列におけるアミド基含有アミノ酸をコードするコドンに相補的なコドンの少なくとも一つが、システインを除くアミド基非含有アミノ酸をコードするコドンに相補的なコドンに置換されたプライマーである。

上記のアミド基含有アミノ酸残基とは、側鎖にアミド基を有するアミノ酸残基を意味し、このようなアミノ酸残基としては、アスパラギン残基およびグルタミン残基が挙げられる。第2の工程においては、これらのアミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させる。ここで、アミド基非含有アミノ酸残基とは、側鎖にアミド基を有しないアミノ酸残基を意味する。システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基としては、天然アミノ酸残基および非天然アミノ酸残基のいずれも適用可能である。天然アミノ酸残基としては、グリシン残基、アラニン残基、バリン残基、ロイシン残基、イソロイシン残基、セリン残基、トレオニン残基、メチオニン残基、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、リシン20 残基、アルギニン残基、フェニルアラニン残基、チロシン残基、プロリン残基、ヒスチジン残基、およびトリプトファン残基が挙げられる。また、非天然アミノ

酸残基としては、天然アミノ酸の側鎖を芳香環等で置換したアミノ酸、化学合成したアミノ酸等の人エアミノ酸の残基等が挙げられる。

本発明においては、アミド基含有アミノ酸残基の少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に変異させることが好ましいが、アミド基非含有アミノ酸残基としてシステイン残基を用いた場合は、得られる F a b' 抗体の等電点は均一になるものの、L鎖との結合に関与しないシステイン残基が多数導入されることとなり、システイン残基を介して発蛍光団色素を結合させた場合、発蛍光団色素の数と位置が不特定となり、複数の等電点を示す混合物となってしまう。このために、本発明においては、アミド基非含有アミノ酸残基としてシステイン残基を用いないことが好ましい。

本発明においては、得られる等電点均一化 F a b' 抗体の等電点の均一性が優れることから、上記のアミド基非含有アミノ酸残基は、アスパラギン酸残基、グルタミン酸残基、グリシン残基、またはセリン残基であることが好ましい。また、用いる F a b' 抗体が、カバットの番号付けによる H鎖第 162 番にアスパラギン残基を有する F a b' 抗体であって、このアスパラギン残基をシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に部位特異的変異させることが好ましい。本発明においては、カバットの番号付けによる H鎖第 162 番のアスパラギン残基を、アスパラギン酸残基に変異させることが更に好ましい。カバットの番号付けによる H鎖第 162 番にアスパラギン残基を有する F a b' 抗体としては、マウス I g G 抗体由来の F a b' 抗体や、ヒト I g G 抗体由来の F a b' 抗体が挙げられる。マウス I g G 抗体およびヒト I g G 抗体には様々なサブクラスが存在するが、サブクラスが異なるものであっても、これらの抗体由来の F a b' 抗体はカバットの番号付けによる H鎖第 162 番にアスパラギン残基を有している。ここで、カバットの番号付けによる H鎖 162 番のアミノ酸残基とは、F a b' 抗体の H鎖 (F d 鎖) における 162 番目のアミノ酸残基を意味し、この 162 番は、Elvin A Kabat による、Sequences of Proteins of Immunological Interest

(Paperback 5th edition (September 1992)) に記載の方法に基づいて特定されるアミノ酸残基の位置を意味する。なお、F a b' 抗体のカバットの番号付けによるH鎖第162番はF d鎖のCH1領域中に存在する。

5 第3の工程において、上述した第2の工程により得られた改変F d鎖遺伝子を、F a b' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子と発現可能な状態で連結させ、改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る。

10 F a b' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子は、第1の工程においてF d鎖遺伝子を得る方法と同様の方法により得ることができる。すなわち、抗原で動物を免疫した後、モノクローナル抗体生産細胞（ハイブリドーマ）を調製し、このモノクローナル抗体生産細胞から、全mRNAを抽出して、このmRNAを用いて1本鎖cDNAを合成し、このcDNAを鋳型としてL鎖遺伝子単離用DNAプライマーを用いてPCRを行えばよい。L鎖遺伝子は、第1の工程においてF d鎖遺伝子を単離すると同時に得ることもできる。この場合は、第1の工程において、F d鎖遺伝子単離用DNAプライマーとL鎖遺伝子単離用DNAプライマーを併用し、cDNAを鋳型としてPCRを行えばよい。

15 本発明においては、F d鎖遺伝子におけるCH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させることに加え、上記のようにして得られたL鎖遺伝子における、CL領域のアミド基含有アミノ酸残基（ア  
20 スパラギン残基および／またはグルタミン残基）をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。この部位特異的変異は、改変F d鎖遺伝子と発現可能な状態で連結させる前もしくは後に行うことができる。この場合、用いるF a b' 抗体が、カバットの番号付けによるL鎖第157番、L鎖第161番、L鎖第190番（いずれもCL領域中に存在）の少なくとも1つにアスパラギン残  
25 基を有するF a b' 抗体であることが好ましく、このアスパラギン残基の少なく

とも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に部位特異的変異させることが好ましい。なかでも、カバットの番号付けによるL鎖第161番のアスバラギン残基を、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に部位特異的変異させることが好ましく、L鎖第161番のアスバラギン残基をアスバラギン酸残基に変異させることが更に好ましい。部位特異的変異の方法に関しては、上記のように、Sambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd Edition, 15.2- 15.113, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989を参考にすることができる。また、CH1領域の場合と同様に、CL領域の部位特異的変異は、CL領域のアミド基含有アミノ酸残基の少なくとも一つをシステインを除くアミド基非含有アミノ酸残基に置換するCL領域増幅用プライマーを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応により実施されることが好ましい。

このようにして得られたL鎖遺伝子と上記の改変Fd鎖遺伝子とを、リンカー塩基配列等を介して連結させることにより、両遺伝子が発現可能な改変Fab'抗体発現遺伝子を得ることができる。より詳しくは、L鎖遺伝子、改変Fd鎖遺伝子およびリンカー塩基配列を、例えば低融点アガロースゲル電気泳動で精製し、適当な制限酵素を用いてこれらを消化させ、改変Fd鎖遺伝子、リンカー塩基配列、L鎖遺伝子の順番に並ぶようにしてライゲーションすることにより、L鎖遺伝子と改変Fd鎖遺伝子とが発現可能な状態で連結した改変Fab'抗体発現遺伝子を得ることができる。なお、リンカー塩基配列は、例えば、タンパク質発現用プラスミドベクターを鋳型とし、リンカー塩基配列単離用のDNAプライマーを用いてPCRにより得ることができる。

上記の第3の工程に続く第4の工程において、前記改変Fab'抗体発現遺伝子を、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る。

この改変の方法は特に制限されないが、例えば、改変Fab'抗体発現遺伝子を鋳型として、Fab'抗体のL鎖のC末端に隣接する部分に荷電性アミノ酸残



基を含むアミノ酸配列を付加するように設計されたプライマーを用いてPCRを行うことにより得ることが可能である。

第5の工程においては、前記荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る。

すなわち、第4の工程で得られた荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を適当なベクターに連結し、それを宿主細胞に導入し形質転換する。ベクターとしては、プラスミドに由来するもの、ファージに由来するもの、コスミド等様々な公知のベクターを使用することができる。宿主細胞としては、例えば、原核細胞すなわち、大腸菌 (SOLR, JM109, XL1-BlueMRF', BL21(DE3), HB2151)、枯草菌、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) 菌、真核細胞すなわち、酵母、動物由来の細胞 (HB101、CHO細胞、COS細胞、COP-5、C127、3T3細胞等) を挙げることができる。宿主細胞としては、Fab'抗体が分解されにくい点から、タンパク質分解酵素非生産菌を使用することが好ましい。

ベクターを宿主細胞に導入する方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法等を含む公知の方法が適用可能である。形質転換体の培養方法に関しても特に制限はなく、形質転換体の培養に適した培地を選択すればよい。また、形質転換体の培養により生産された等電点均一化Fab'抗体を抽出する方法としては、細胞をホモジナイズする方法、SDS等の界面活性剤や酵素を用いて細胞膜を溶解させる方法、超音波処理等がある。抽出された等電点均一化Fab'抗体の精製法としては、例えば、超遠心や密度勾配遠心を利用した遠心分離法、アフィニティーカラム等を利用したカラム分離法、ポリアクリルアミドゲル等を利用したゲル分離法等が挙げられる。

第6の工程では、第5の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体のL鎖との

結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。

発蛍光団色素としては上述したようなものを用いることができ、発蛍光団色素と等電点均一化 F a b' 抗体とを反応させたときに生じる結合としては、上述のように、チオエステル結合、ジチオエステル結合、チオエーテル結合からなる群より選ばれる少なくとも 1 つの結合であることが好ましい。このとき、等電点均一化 F a b' 抗体の C H 1 領域の C 末端に隣接するアミノ酸配列中のシステイン残基の S H 基に発蛍光団色素を直接反応させてもよいが、発蛍光団色素中の官能基に反応性の官能基と、等電点均一化 F a b' 抗体の前記 S H 基に反応性の官能基とをそれぞれ少なくとも 1 個有した多官能化合物を介して結合させてもよい。

以上述べた遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法では、第 3 の工程において改変 F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子を発現可能な状態で連結させた後に、第 4 の工程において、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変したが、改変 F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子を連結させる前に、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように、L 鎖遺伝子を改変してもよい（この手法を、遺伝子工学的手法による第 2 の製造方法と呼ぶ）。

すなわち、遺伝子工学的手法による第 2 の製造方法においては、第 1 の工程において、F a b' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子を提供し、第 2 の工程において、前記 F d 鎖遺伝子の前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 F d 鎖遺伝子を得る。

この第 1 の工程および第 2 の工程は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 1 の工程および第 2 の工程と同様に行うことができる。なお、C H 1 領域の C 末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数

の好適な範囲、および当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数の好適な範囲、抗原や抗体の種類は、遺伝子工学的手法による第1の製造方法の第1の工程に記載と同様である。また、用いることのできるアミド基含有アミノ酸残基およびアミド基非含有アミノ酸残基の種類や好適な残基は、遺伝子工学的手法による第1

5 の製造方法の第2の工程に記載の方法と同様である。

第3の工程において、F a b' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子を提供するが、L鎖遺伝子は、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第3の工程に記載の方法と同様にして得ることができる。また、L鎖遺伝子は、本製造方法の第1の工程においてF d鎖遺伝子を得るのと同時に得ることもできる。

10 第3の工程に続く第4の工程においては、L鎖遺伝子を、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与L鎖遺伝子を得る。この工程における改変は、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第4の工程に記載の方法と同様に行うことができる。なお、L鎖遺伝子における、C L領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコ

15 ドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。この部位特異的変異は第3の工程において行うこともできる。

第5の工程においては、上記改変F d鎖遺伝子と、上記荷電性付与L鎖遺伝子を発現可能な状態で連結させ、荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る。

20 この工程において、発現可能な状態で連結させる条件に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第3の工程に記載の方法と同様である。

次いで、第6の工程において、前記荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つC H 1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸

25

配列が形成された、等電点均一化 F a b' 抗体を得て、第 7 の工程において、等電点均一化 F a b' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に蛍光団色素を結合させる。この第 6 の工程および第 7 の工程は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 5 の工程および第 6 の工程にそれぞれ記載の方法と同様である。

以上述べた遺伝子工学的手法による第 1 および第 2 の製造方法では、F d 鎖遺伝子の部位特異的変異を行った後に、L 鎖遺伝子と連結を行ったが、遺伝子工学的手法による第 3 の製造方法として、F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子とを連結した後に、F d 鎖遺伝子の部位特異的変異を行うことも可能である。

すなわち、まず、第 1 の工程として、F a b' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子と、該 F a b' 抗体の L 鎖をコードする L 鎖遺伝子とを提供する工程を実施し、それに続く第 2 の工程において、この F d 鎖遺伝子と L 鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、F a b' 抗体発現遺伝子を得る。ここで、F d 鎖遺伝子は、上述の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 1 の工程に記載の方法と同様にして得ることができ、L 鎖遺伝子は、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 3 の工程に記載の方法と同様にして得ることができる。F d 鎖遺伝子および L 鎖遺伝子を発現可能な状態で連結させる方法も、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 3 の工程に記載の方法と同様である。すなわち、タンパク質発現用プラスミドベクターを鋳型とし、リンカー塩基配列単離用の DNA プライマーを用いてリンカー塩基配列を得て、このリンカー塩基配列と F d 鎖遺伝子および L 鎖遺伝子をライゲーションすればよい。なお、C H 1 領域の C 末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数の好適な範囲、および当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数の好適な範囲も、遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法と同様である。

第3の工程では、前記F a b'抗体発現遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、且つ、前記F a b'抗体発現遺伝子における前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、荷電性付与改変F a b'抗体発現遺伝子を得る。

ここで、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するようにする改変と、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異する改変とを行う順には特に制限はない。

例えば、F a b'抗体発現遺伝子を、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与F a b'抗体発現遺伝子を得て、該荷電性付与F a b'抗体発現遺伝子における、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異し、荷電性付与改変F a b'抗体発現遺伝子を得てもよく、F a b'抗体発現遺伝子における、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異し、改変F a b'抗体発現遺伝子を得て、該改変F a b'抗体発現遺伝子を、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変F a b'抗体発現遺伝子を得てもよい。

第3の工程における、部位特異的変異の方法は、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第2の工程に記載の方法と同様に行うことができる。用いることのできるアミド基含有アミノ酸およびアミド基非含有アミノ酸残基の種類や好適な残基に関しても、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法と同様である。また、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸

配列が発現するようにする改変は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 4 の工程に記載の方法と同様に行うことができる。

5       なお、第 3 の工程において、F a b' 抗体発現遺伝子における C L 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。この部位特異的変異は第 1 の工程において行うこともできる。

10       第 4 の工程においては、第 3 の工程において得られた荷電性付与改変 F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b' 抗体を得る。このとき用いられる宿主細胞の種類、宿主細胞に導入されるベクターの種類、ベクターを宿主細胞に導入する方法、および形質転換体の培養により生産された等電点均一化 F a b' 抗体を抽出する方法に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第 15       1 の製造方法における第 5 の工程に記載の方法と同様である。

20       第 5 の工程においては、第 4 の工程で得られた等電点均一化 F a b' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。用いられる発蛍光団色素および好適なものの種類、システイン残基と発蛍光団色素との結合に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 6 の工程に記載の方法と同様である。

      上記の遺伝子工学的手法による第 1 ～第 3 の製造方法に加えて、以下に述べる遺伝子工学的手法による第 4 の製造方法も適用可能である。

25       すなわち、まず、第 1 の工程として、第 1 の F a b' 抗体の C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする C H 1 遺伝子と、該第 1 の F a b' 抗体の C L 領域をコードする C L 遺伝子とを提供する工程を行う。

第1の工程におけるCH1遺伝子は、例えば、上述のように、モノクローナル抗体生産細胞（ハイブリドーマ）細胞から、全mRNAを抽出して、このmRNAを用いて1本鎖cDNAを合成し、このcDNAを鋳型としてCH1領域をカバーするプライマーであって、CH1領域のC末端に隣接する部分にL鎖との結合に  
5 関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列を導入するためのプライマーを用いてPCRを行うことにより得ることができる。CH1遺伝子はCH1領域を含む領域をコードするものであればよく、CH1領域のみをコードするものでも、CH1領域とVH領域をコードするものでもよい。また、CH1領域とヒンジ領域をコードするものでも、CH1領域とVH領域とヒンジ領域とをコードする  
10 ものもよい。なお、VH領域およびヒンジ領域に関してはその少なくとも一部をコードすればよい。なお、CH1領域のC末端に隣接する部分に導入するアミノ酸配列のアミノ酸残基の数の好適な範囲、および当該アミノ酸配列中のシステイン残基の数の好適な範囲、抗原や抗体の種類は、遺伝子工学的手法による第1の製造方法の第1の工程に記載の方法と同様である。

15 第1の工程におけるCL遺伝子は、上記のCH1遺伝子を得るのと同時にまたは別に、モノクローナル抗体生産細胞細胞由来のmRNAを用いて合成された1本鎖cDNAを鋳型として、CL遺伝子単離用プライマーを用いてPCRを行うことにより得ることができる。

20 なお、第1の工程で得られたCL遺伝子におけるアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。

上記の第1の工程に続く第2の工程では、前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異  
25 させて、改変CH1遺伝子を得る。

この部位特異的変異の方法は、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法

における第2の工程に記載の方法と同様に行うことができる。用いることのできるアミド基含有アミノ酸残基およびアミド基非含有アミノ酸残基の種類や好適な残基に関しても、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法と同様である。

次いで、第3の工程において、前記改変CH1遺伝子を制限酵素で切断しCH1領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る。ここで用いられる制限酵素  
5 に関しては特に制限はないが、制限酵素としては、例えば、BamHI、BglIを挙げることができる。

第4の工程において、第2のFab'抗体のVH領域をコードするVH遺伝子と、該第2のFab'抗体のVL領域をコードするVL遺伝子とを提供する。こ  
10 こで第2のFab'抗体のVH遺伝子とVL遺伝子は、例えば、第2のFab'抗体が由来する抗体のmRNAを用いて1本鎖cDNAを合成し、このcDNAを鋳型としてVH鎖遺伝子単離用DNAプライマーおよびVL遺伝子単離用DNAプライマーを用いてPCRを行うことにより得ることができる。なお、第2のFab'抗体は、そのクラスやサブクラスが第1のFab'抗体のものと異なっ  
15 ていても同一であってもよい。例えば、第2のFab'抗体がマウスIgA抗体であり、第1のFab'抗体がマウスIgG抗体であってもよい。更に、第2のFab'抗体が由来する動物種は、第1のFab'抗体のものと異なっても同一であってもよい。例えば、第2のFab'抗体がヒトIgG抗体であり、第1のFab'抗体がマウスIgG抗体であってもよい。

第4の工程に続く第5の工程においては、上記遺伝子断片、上記CL遺伝子、  
20 上記VH遺伝子、および上記VL遺伝子を発現可能な状態で連結し、改変Fab'抗体発現遺伝子を得る。発現可能な状態で連結させる方法は、遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第3の工程に記載の方法と同様である。

第6の工程として、前記改変Fab'抗体発現遺伝子を、前記Fab'抗体の  
25 L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る。第6の工程における



改変は、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 4 の工程に記載の方法と同様に行うことができる。

次いで第 7 の工程において、前記荷電性付与改変 F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域の C 末端に隣接して L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b' 抗体を得る。

このとき用いられる宿主細胞の種類、宿主細胞に導入されるベクターの種類、ベクターを宿主細胞に導入する方法、および形質転換体の培養により生産された等電点均一化 F a b' 抗体を抽出する方法に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 5 の工程に記載の方法と同様である。

第 8 の工程において、第 7 の工程で得られた等電点均一化 F a b' 抗体における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。用いられる発蛍光団色素および好適なものの種類、システイン残基と発蛍光団色素との結合に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第 1 の製造方法における第 6 の工程に記載の方法と同様である。

以上述べた遺伝子工学的手法による第 4 の製造方法では、第 5 の工程において改変 C H 1 遺伝子の遺伝子断片、C L 遺伝子、V H 遺伝子および V L 遺伝子を発現可能な状態で連結させた後に、第 6 の工程において、C L 領域の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変したが、C L 遺伝子をその他の遺伝子（または遺伝子断片）と連結させる前に、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変してもよい（この手法を、遺伝子工学的手法による第 5 の製造方法と呼ぶ）。

すなわち、遺伝子工学的手法による第 5 の製造方法においては、第 1 の工程において、第 1 の F a b' 抗体の C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする C

H1遺伝子と、該第1のFab'抗体のCL領域をコードするCL遺伝子とを提供し、第2の工程では、前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変CH1遺伝子を得る。さらに、第3の工程において、前記改変CH1遺伝子を制限酵素で切断しCH1領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る。

遺伝子工学的手法による第5の製造方法における第1～第3の工程は、遺伝子工学的手法による第4の製造方法における第1～第3の工程と同様に行うことができる。また、第1の工程で得られたCL遺伝子におけるアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させてもよい。

次いで、第４の工程において、前記ＣＬ遺伝子を、前記ＣＬ領域のＣ末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与ＣＬ遺伝子を得る。第４の工程における改変は、上記の遺伝子工学的手法による第１の製造方法における第４の工程に記載の方法と同様に行うことができる。なお、この第４の工程は、第２の工程の前に行うこともできる。

次いで、第5の工程として、第2のF a b' 抗体のV H領域をコードするV H遺伝子と、該第2のF a b' 抗体のV L領域をコードするV L遺伝子を提供する工程を行い、第6の工程として、前記遺伝子断片、前記荷電性付与C L遺伝子、前記V H遺伝子および前記V L遺伝子を発現可能な状態で連結し、荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る。

VH遺伝子およびVL遺伝子を提供する工程は、遺伝子工学的手法による第4の製造方法における第4の工程と同様にして行うことができ、発現可能な状態で連結させる方法は、遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第3の工程に記載の方法と同様にして行うことができる。

次いで第 7 の工程において、前記荷電性付与改変 Fab' 抗体発現遺伝子で宿

主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る。

- 5       このとき用いられる宿主細胞の種類、宿主細胞に導入されるベクターの種類、ベクターを宿主細胞に導入する方法、および形質転換体の培養により生産された等電点均一化Fab'抗体を抽出する方法に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第5の工程に記載の方法と同様である。

- 10       第8の工程において、第7の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる。用いられる発蛍光団色素および好適なものの種類、システイン残基と発蛍光団色素との結合に関しては、上記の遺伝子工学的手法による第1の製造方法における第6の工程に記載の方法と同様である。

(実施例)

- 15       以下、本発明の好適な実施例についてさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。なお、実施例において、遺伝子工学的手法に関して特に記載のないものはSambrook et al., Molecular Cloning : A Laboratory Manual 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に従った。また、特に、記載のない試薬類は宝酒造株式会社または和光純薬工業株式会社より購入の試薬を使用した。
- 20

本実施例において使用する略語の名称を以下に示す。

PCR : ポリメラーゼ連鎖反応 (遺伝子増幅法)

BAP : bacterial alkaline phosphatase

IPTG : isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside

- 25       PBS : phosphate buffered saline

BSA : bovine serum albumin

(1) ハイブリドーマの樹立

ヒト アルファ 1 アンチトリプシン (カルピオケム-ノバピオケム社製) を免疫抗原として用い、抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン抗体を産生するハイブリドーマを以下に示す方法により作製した。

- 5       上記免疫原でBALB/cマウスを4回免疫後、脾細胞を採取し、培養マウス骨髓細胞 [X63Ag8] とポリエチレングリコールを用いて細胞融合を行い、クローニングした。得られたクローンの培養上清中の抗体の前述の免疫原への結合活性を酵素抗体法にて測定し、反応が陽性と思われるクローンについて、さらに、間接蛍光法を用いて確認し、抗アルファ 1 アンチトリプシン抗体を産生するハイブリドーマを9種類確立した。これらハイブリドーマ産出の抗体はヒト アルファ 1 アンチトリプシンに結合するものである。以下に述べる等電点均一化 F a b' 抗体の F d 鎖遺伝子、L 鎖 (κ 鎖) 遺伝子の調製には、抗アルファ 1 アンチトリプシン活性を有するこれらの抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン抗体を産生する細胞を使用した。

15       (2) 抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現遺伝子の単離

ヒト アルファ 1 アンチトリプシンに対する I g G 1 抗体を産出するハイブリドーマより抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現遺伝子を以下のように単離した。

- 20       すなわち、抗ヒト アルファ 1 アンチトリプシン F a b' 抗体を産生する細胞からBioMag mRNA purification kit (PerSeptive) のプロトコールに従って全RNAを抽出し、cDNA合成システム・プラス (アマシャム ファルマシア バイオテク社製) を用いて1本鎖cDNAを合成した。Kabatら (Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed., Public Health Service, NIH, Washington DC, 1991) の分類した可変領域 (V 領域) と定常領域 (C 領域) の核酸塩基配列をもとにして合成した、F d 鎖遺伝子単離用DNAプライマーおよびL鎖遺伝子単離用DNAプライマーを用いて、上記1本鎖cDNAを鋳型として
- 25

ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。ここで、プライマー設計には、Hoogenboom HR ら (Nucleic Acids Res 1991 Aug 11;19(15):4133-7)、及びKang AS ら (Methods (San Diego) (1991), 2(2),111 -18) の文献を参考にした。

ヒト アルファ 1 アンチトリプシンに対して結合する抗体は、F a b' 抗体として発現させるため、重鎖 (H鎖)、軽鎖 (L鎖) とともに定常領域を含むように DNAプライマーを設計した。すなわち、F d鎖遺伝子単離用DNAプライマーとして、5' 側プライマー (以下に示すF 5-1プライマー) および3' 側プライマー (以下に示すF 3プライマー) を設計し、L鎖遺伝子単離用DNAプライマーとして、5' 側プライマー (以下に示すK a p p e r 5プライマー) および3' 側プライマー (以下に示すK 3-1プライマー) を設計した。

F d鎖遺伝子単離用の5' 側プライマーであるF 5-1プライマーは、以下に示す配列 (配列番号1) を有するものを用い、F d鎖遺伝子単離用の3' 側プライマーであるF 3プライマーは、以下に示す配列 (配列番号2) を有するものを用いた。なお、以下の配列において、5'、3' は、それぞれプライマーの5' 側、3' 側を表し、SはCまたはG、MはAまたはC、RはAまたはG、WはAまたはTを示す。

F 5-1プライマー (配列番号1):

5' SAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3'

F 3プライマー (配列番号2):

5' GCGTCATCTAGAACAACCACAATCCCTGGGCACA 3'

なお、F 3プライマーは、CH1領域のC末端に隣接する部分にL鎖とのジスルフィド結合に関与しないシステイン残基を含む塩基配列を導入可能なように設計し、また、リンカーを介してL鎖と連結させるため、Xba Iサイトが付加するように設計した。

L鎖遺伝子単離用の5' 側プライマーであるK a p p e r 5プライマーは、以下に示す配列 (配列番号3) を有するものを用い、L鎖遺伝子単離用の3' 側プ

ライマーであるK 3-1プライマーは、以下に示す配列（配列番号4）を有するものを用いた。なお、WはAまたはT、SはCまたはG、BはA以外の塩基、NはA、T、G、C、MはAまたはC、DはC以外の塩基、YはCまたはT、HはG以外の塩基をそれぞれ表す。

5 Kapper 5 プライマー（配列番号3）：

5' CCAGWTSYGAGCTCSWBNTSACNCAGNMDYCH 3'

K 3-1 プライマー（配列番号4）：

5' ACACTCATTCTGTTGAAGCT 3'

PCRの条件は、94℃1分、55℃1分、72℃1分で30サイクル行った。  
10 。PCR後、得られたFd鎖、リンカー塩基配列、L鎖（κ鎖）のDNA断片を、低融点アガロースゲル電気泳動で精製し、Fd鎖をXbaIで、リンカー塩基配列をXbaI、SacIで、L鎖（κ鎖）をSacIで消化した。リンカー塩基配列を挟んで、Fd鎖、リンカー塩基配列、L鎖（κ鎖）の順番に並ぶように、各DNA断片をライゲーションした。ライゲーション産物をフェーノール／クロロフォルム／イソアミルアルコール（25/24/1）で抽出した。これをTEバッファーに溶解し鋳型  
15 として、Fd鎖の5'側にSfiIサイト、L鎖の3'側にNot Iサイトを付加するように設計されたプライマーで再度、PCRを行った。PCRは、94℃1分、55℃1分、72℃2.5分で25サイクル行った。

得られたPCR増幅産物を精製後、SfiI（20U per reaction）で50℃にて4  
20 時間、Not I（40U per reaction）で37℃にて4時間で消化した。これをpCANTAB5Eプラスミドベクター（アマシャム ファルマシアバイオテク社製）にクローニングした（図2AおよびB参照）。pCANTAB5Eプラスミドベクターは、ベクターに組み込まれた遺伝子を発現し、大腸菌のペリプラズム外に遺伝子由来の蛋白質を分泌するシグナルペプチドを含有している。ベクター構築の手順および方法に関しては、遺伝子工学の分野で慣用されているものを用いることができる。

25

（3）抗ヒト アルファ1アンチトリプシン Fab' 抗体発現のための形質転換

抗ヒト アルファ1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現遺伝子をpCANTAB5Eプラスミドベクターにクローニングした抗ヒト アルファ1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現プラスミドを、市販の大腸菌HB2151(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)に形質転換した。大腸菌HB2151のコンピテント細胞化はExpression Module/Recombinant Phage Antibody System (アマシャム ファルマシアバイオテク社製)のプロトコールに従った。形質転換した大腸菌HB2151をSOBAG培地に播き、30℃でオーバーナイトでインキュベーションした。生じたコロニーでHRP/Anti-E tag Conjugate(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)のプロトコールに従いコロニーリフトアッセイ (colony lift assay) を行ない、ヒト アルファ1 アンチトリプシンに対して抗原抗体反応を起す F a b' 抗体発現菌をスクリーニングした。

スクリーニングした F a b' 抗体発現菌を複数個選択してExpression Module/Recombinant Phage Antibody System (アマシャム ファルマシアバイオテク社製)のプロトコールに従い、2YT-AG培地に接種し、30℃で一夜振盪培養した。振盪培養した培養液を10倍量の2YT-AG培地に加え、30℃でA600が、0.5になるまで振盪培養した。室温で遠心分離して、集菌し、上清を除いた。菌を同量の、2YT-AI (グルコース不含、100  $\mu$ g/ml アンピシリン、1mM IPTGを含む) 培地に懸濁して、30℃で終夜振盪培養し、抗体を誘導した。次いで、遠心分離で菌を沈殿化して、上清を取り、IPTGにより誘導された抗ヒト アルファ1 アンチトリプシン F a b' 抗体を含む培養上清を100  $\mu$ l 用い、マイクロタイタープレートに抗原吸着プレートとして、ヒト アルファ1 アンチトリプシン (カルビオケム-ノババイオケム社製) を固定化し、HRP/Anti-E tag Conjugate(アマシャム ファルマシアバイオテク社製)のプロトコールに従い、ELISAを行い抗ヒト アルファ1 アンチトリプシン F a b' 抗体発現菌をスクリーニングした。

#### (4) 塩基配列決定用の形質転換と抗体遺伝子の塩基配列の決定

スクリーニングにより得られた抗ヒト アルファ1 アンチトリプシン F a b'

抗体発現菌よりプラスミドDNAを抽出し、塩基配列決定用に、市販の大腸菌XL10-GOLD(Stratagene社製)に形質転換した。抗ヒト アルファ1 アンチトリブシン Fab' 抗体発現遺伝子で形質転換したXL10-GOLDはEpicurian Coli XL10-Gold ultracompetent Cells (Stratagene社製)に従い、抗体遺伝子を発現するベクターのDNA (約10 ng) を混合し、30分間水中に放置した。次いで42℃で30秒間 熱処理を行った後、NZY培地 (NZアミン10 g、酵母エキス5 g、塩化ナトリウム5 g、塩化マグネシウム12.5mM、硫酸マグネシウム12.5mM、グルコース20mM:、pH7.5: 1リットルあたり) 900 μLを加え、37℃で約1時間振盪培養した。50 μg/ml アンピシリンを含むLB寒天培地 (トリブトン10 g、酵母エキス5 g、塩化ナトリウム5 g、寒天15 g [pH7]: 1リットルあたり) に塗り広げ、形質転換された抗ヒト アルファ1 アンチトリブシン Fab' 抗体発現遺伝子を含む耐性株を選抜した。

選抜した耐性株より、抗ヒト アルファ1 アンチトリブシン Fab' 抗体発現遺伝子を含むpCANTAB5Eプラスミドを抽出して、ジデキオキシヌクレオチド (パーキンエルマー社製) を用いたチェーンターミネータ法により抗ヒト アルファ1 アンチトリブシン Fab' 抗体発現遺伝子の各部の塩基配列を決定したところ発現可能なオープンリーディングフレーム (ORF) をとっていた。また、単離された抗ヒト アルファ1 アンチトリブシン Fab' 抗体発現遺伝子は、Fd鎖遺伝子 (VH領域およびCH1領域の遺伝子) およびL鎖遺伝子 (VL領域およびCL領域の遺伝子) を含むものであった。

#### (5) 大腸菌産出抗ヒト アルファ1 アンチトリブシン Fab' 抗体の誘導と精製

大腸菌産出抗ヒト アルファ1 アンチトリブシン Fab' 抗体を以下に示す実験に使用するべく、スクリーニングした細胞株を用い、培養スケールを拡大して抗体を誘導し、精製した。すなわち、RPAS Purification Module (アマシャムファルマシアバイオテック社製) のプロトコールに従い以下の手順で抗ヒト アル



ファ1 アンチトリブシンFab' 抗体の誘導および精製を行った。

スクリーニングした抗ヒト アルファ1 アンチトリブシンFab' 抗体発現遺伝子を含む大腸菌HB2151細胞株より、単一コロニーを拾い、Expression Module/Recombinant Phage Antibody System (アマシャム ファルマシアバイオテク社製)のプロトコールに従い、2YT-AG培地に接種し、30℃で一夜振盪培養した。振盪培養した培養液を10倍量の2YT-AG培地に加え、30℃でA600が、0.5になるまで振盪培養した。室温で遠心分離して、集菌し、上清を除いた。菌を同量の、2YT-AI (グルコース不含) 培地に懸濁して、30℃で終夜振盪培養した。遠心分離で菌を沈殿化して、上清を取り、0.45umのフィルター (ミリポア社製) で濾過したあと、pHを7に調整して、培養上清とした。

IPTGにより誘導された抗ヒト アルファ1 アンチトリブシンFab' 抗体を含む培養上清を抗E-tagアフィニティカラムを使用し、5ml/分の流速でカラムに結合させ、添付の洗浄バッファー (Binding buffer) 25ml (5ml/分の流速) を流して、抗体を含まない培養上清を洗い出し、添付の溶出バッファー (Elution buffer) 10mlにて大腸菌産出抗ヒト アルファ1アンチトリブシンFab' 抗体を溶出 (5ml/分の流速) させた。溶出した抗ヒト アルファ1 アンチトリブシンFab' 抗体に、ただちに、中和バッファー (Neutralization buffer) を溶出バッファー (Elution buffer) に対して10分の1量加えて、中和した。以上のように、抗E-tag抗体をリガンドとして用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。中和された抗ヒト アルファ1 アンチトリブシンFab' 抗体はマイクロコン (画分 分子量30000用) (ミリポア社製) を用いて、濃縮した後、PBSバッファー1mlに溶解して-80℃に保存した。

#### (6) 大腸菌産出抗ヒト アルファ1アンチトリブシンFab' 抗体の蛍光標識化

蛍光色素 (蛍光標識剤) であるテトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミドの調製は以下のように行った。すなわち、テトラメチルローダミン-5-ヨー

ドアセタミド（モレキュラーブローブス社製）1mgを50%アセトニトリル0.6mlに溶解し、10,000rpm、5分間遠心分離を行い、沈澱を除去した。上澄を25%アセトニトリル-0.1%トリフルオロ酢酸溶液で平衡化した逆相クロマトグラフカラム（東ソーODS-80Ts、直径4.6mm、長さ25cm）にかけ、30分間にわたって25~55%のアセトニトリルの濃度直線勾配をかけて溶出し、280nmの吸収をモニターすることで検出を行った。最も大きなピークを分取し、543nmにおけるモル吸光係数を87,000として吸光度測定によってその濃度を決定した。これを精製テトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミドとして、精製した抗ヒトアルファ1アンチトリブシンFab'抗体の蛍光標識に用いた。

精製した抗ヒトアルファ1アンチトリブシンFab'抗体は以下のようにして蛍光標識化した。すなわち、抗ヒトアルファ1アンチトリブシンFab'抗体濃縮液（100μl）を10倍量の0.1Mリン酸バッファー、5mM EDTA入り（pH7.0）で希釈し、マイクロコン（画分分子量30000用）（ミリポア社製）で遠心分離してバッファーを交換した。この操作を2回繰返した。抗ヒトアルファ1アンチトリブシンFab'抗体200μlに対して100mMメルカプトエチルアミン（ナカライテスク社製）を20μl加え、攪拌して37℃で30分インキュベートした。マイクロコン（画分分子量30000用）（ミリポア社製）で再び、20μlに濃縮して、200μlの0.1Mリン酸バッファー、5mM EDTA入り（pH7.5）で限外濾過を行った。

25nmolのテトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミド（モレキュラーブローブス社製）を、5μlのN,N-ジメチルホルムアミド（シグマ社製）に溶解させ、75μlの0.1Mリン酸バッファー5mM（EDTA入り（pH7.5））を加え、1mMメルカプトエチルアミン（ナカライテスク社製）を5μl加え、37℃で10分間インキュベートした。これをメルカプトエチルアミンで処理した抗ヒトアルファ1アンチトリブシンFab'抗体と混合し、暗所で一夜反応させた

。反応産物は Sephadex G-25 (アマシャム ファルマシアバイオテク社製) で、反応していない蛍光色素と、蛍光標識した抗ヒト アルファ 1 アンチトリブシン Fab' 抗体 (蛍光色素 1 分子により標識されているため、以下場合により一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリブシン Fab' 抗体と呼ぶことがある) を分離して、以下の実験に用いた。一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリブシン Fab' 抗体の濃度は、543 nm におけるモル吸光係数を 87,000 とし、吸光度測定によって決定した。

#### (7) 蛍光検出等電点電気泳動による評価

得られた一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリブシン Fab' 抗体をベックマン社製キャピラリー電気泳動装置 P/ACE 5510 を用いて分離・検出を行った。キャピラリーとしては内壁をポリアクリルアミドで共有結合的に被覆した内径 0.05 mm、外径 0.375 mm、全長 27 cm の溶解シリカキャピラリー (ジエールサイエンス社製) を使用し、陽極側から 20 cm の位置でレーザー励起による蛍光検出を行った。キャピラリーを Pharmalyte 3-10 (アマシャム ファルマシアバイオテク社製、原液の 40 倍希釈)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (Sigma 社製、以下 HPMC と略、終濃度 0.125%)、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン (TEMED、ファルマシアバイオテク社製、終濃度 0.6%) を含む両性担体液で満たした後、一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリブシン Fab' 抗体を  $2 \times 10^{-8}$  M 含む両性担体液を陽極より高圧モードにて 30 秒間注入した。

陽極液として HPMC (終濃度 0.1%) を含む 20 mM リン酸、陰極液として 20 mM NaOH を用い、13.5 kV (500 V/cm) の電圧を 10 分間印荷した後、同じ電圧を維持したまま、陽極側に低圧モードで陽極液を注入し、pH 勾配中に焦点化した一分子蛍光標識抗ヒト アルファ 1 アンチトリブシン Fab' 抗体を検出した。蛍光色素の励起はアルゴンイオンレーザー (ベックマン社製、Laser Module 488) 波長 488 nm を用い、フィルターハウジングユニットには 488 nm ノッ

チフィルター（ベックマン社製）とローダミン用バンドパスフィルター（旭分光社製、特注品）をセットして検出を行った。得られた結果を図3に示す。図3からわかるように、大腸菌産出の一分子蛍光標識抗ヒト アルファ1アンチトリプシン F a b' 抗体の等電点は不均一であった。

5      (8) 部位特異的変異法による等電点不均一性の是正

抗ヒト アルファ1アンチトリプシン F a b' 抗体の等電点は不均一性を是正するために、以下に述べるような、CH1領域に部位特異的変異を生じせしめるDNAプライマーを設計して、抗体の改変を行った。なお、以下の実施例において、例えば、カバットの番号付けによるH鎖第162番のN(アスパラギン)をD  
10      (アスパラギン酸)に変換する(または、変換した)ことを表す場合は、「H-N162D」なる記載を用いる場合がある。すなわち、カバットの番号付けによるH鎖第162番のN(アスパラギン)をD(アスパラギン酸)に変換したF a b' 抗体を「H-N162D改変F a b' 抗体」のように表し、この抗体を発現する遺伝子を「H-N162D改変F a b' 抗体発現遺伝子」のように表す場合がある。  
15      。

DNAプライマーとしては、以下の塩基配列を有するF5-1プライマー(配列表における配列番号5)およびH-N162D-BamHIプライマー(配列表における配列番号6)を用いた。なお、以下の配列において、5'、3'は、それぞれプライマーの5'側、3'側を表し、SはCまたはG、MはAまたはC  
20      、RはAまたはG、WはAまたはTを示す。

F5-1プライマー(配列番号5):

5' SAGGTSMARCTGCAGSAGTCWGG 3'

H-N162D-BamHIプライマー(配列番号6):

5' GCTGGACAGGGATCCAGAGTCCCAGGTCAGTGT 3'

25      これらのプライマーを用いて、(2)で得られた抗ヒト アルファ1アンチトリプシン F a b' 抗体発現遺伝子を鋳型として、PCRを行うことにより、カバッ

トの番号付けによるH鎖第162番のN(アスパラギン)がD(アスパラギン酸)に変換された遺伝子断片を調製し、これをBamHIで消化した。この消化産物に、抗ヒト アルファ1アンチトリプシンFab'抗体発現遺伝子のBamHI消化産物を低融点アガロース電気泳動から回収した遺伝子断片をライゲーションした。

- 5      ライゲーションした産物を、(2)で用いたものと同じpCANTAB5Eプラスミドベクターに連結させるために、以下の塩基配列を有するF5-2プライマーおよびK3-2プライマーを用いてPCRを行い、SfiI、NotIの制限酵素を用いて消化した後、pCANTAB5Eプラスミドベクターにライゲーションし、H-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子を含む発現ベクターを作製した。

- 10      F5-2プライマー(配列番号7):

5' CATGTGAACTGACTGGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCAGG 3'

- K3-2プライマー(配列番号8):

5' CCACGATTCTGCGGCCGCACACTCATTCCTGTTGAAGCTCTTTGTAAT 3'

- 15      上記発現ベクターを、大腸菌HB2151に形質転換した。上記と同様にして抗体を誘導し、ELISAによるスクリーニングをおこなった。陽性反応を示す菌からプラスミドを抽出して、大腸菌XL10菌へ形質転換した。形質転換されたXL10菌からシーケンス反応に使用する量のプラスミドを抽出して、H-N162D改変Fab'抗体発現遺伝子の塩基配列を確認した。改変体作製においては、ポリメラーゼとしては、適合度(fidelity)の高いPyrobestポリメラーゼ(宝酒造社製)を用いた。塩基配列を確認した後、上記発現ベクターで形質転換された大腸菌HB21
- 20      51の培養スケールを拡大して、H-N162D改変Fab'抗体を産出させ、該抗体をアフィニティーカラムにより精製し、H-N162D改変Fab'抗体の精製物を得た。

- 25      上記の方法により確認された、H-N162D改変Fab'抗体のCH1領域およびCH1領域のC末端に隣接する部分の配列(配列表における配列番号9)を以下に示す。

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWDSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS  
STWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKIIVPRDCGCSR

5 この配列において、C末端側（右側）のVPRDCGCSRの配列が、CH1領域のC末端に隣接する部分に導入されたL鎖との結合に関与しないシステイン残基（C）を含むアミノ酸配列である。なお、L鎖との結合に関与しないシステイン残基はVPRDCGCSRの配列におけるC末端側のシステイン残基である。また、VPRDCGCSRの配列を除く部分はCH1領域の配列である。

なお、H-N162D改変を行う前のFab'抗体における同様の部分の配列（配列表における配列番号10）は以下のとおりである。

10 AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPS  
STWPSETVTCNVAHPASSTKVDDKIIVPRDCGCSR

上記2つの配列を比較すると、H-N162D改変を行う前のFab'抗体における、カバットの番号付けによるH鎖第162番のアスパラギン残基（下線を付したN）が、改変後にはアスパラギン酸（下線を付したD）になっていることがわかる。また、本実施例においては、H-N162D改変Fab'抗体におけるCH1領域のC末端に隣接する部分の配列（VPRDCGCSR）は、H-N162D改変を行う前のFab'抗体におけるCH1領域のC末端に隣接する部分の配列（VPRDCGCSR）と同一となっている。

20 （9）蛍光標識等電点均一化Fab'抗体の蛍光検出キャピラリー等電点電気泳動による分離・検出

（8）で得られたH-N162D改変Fab'抗体を、（6）に記載の方法と同様にして、テトラメチルローダミン-5-ヨードアセタミド（モレキュラープローブ社製）で蛍光標識して、一分子蛍光標識Fab'抗体を得た。この一分子蛍光標識Fab'抗体を、（7）と同様にしてベックマン社製キャピラリー電気泳動装置P/ACE5510を用いて分離・検出を行った。その結果を図4に示す。

図4からわかるように、一分子蛍光標識されたH-N162D改変Fab'抗

体をキャピラリー電気泳動した場合は、移動時間 29 分付近に一つの大きなピークが現われ、他の部分には実質的にピークが現われなかった。これは、H-N 162D 改変 Fab' 抗体の等電点が均一であることを意味する。

(10) 荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列の付加

5 (8) で得られた H-N 162D 改変 Fab' 抗体の L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列を付加するため、荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列挿入用の DNA プライマーを設計して、上述の H-N 162D 改変 Fab' 抗体発現遺伝子を鋳型として用い、PCR を行うことにより、L 鎖の C 末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加された H-N

10 162D 改変 Fab' 抗体を発現する遺伝子（以下、場合により、荷電性付与 H-N 162D 改変 Fab' 抗体発現遺伝子と呼ぶ）を得た。DNA プライマーとしては、上述の F5-1 プライマー（配列番号 5）、F5-2 プライマー（配列番号 7）、および以下に示す K3+5 RPS プライマー（配列番号 11）を用いた。

15 K3+5 RPS プライマー（配列番号 11）：

5' GGTGATCGGCCCCGAGGCCGGTCTACTTGGTCGACTTGGTCGACTAGGTCTAGAAGGACGTGAA  
CACTCATTCCTGTTGAAGCTC 3'

荷電性付与 H-N 162D 改変 Fab' 抗体発現遺伝子を、制限酵素である SfiI、または SfiI および Not I を用いて、消化した後、タンパク質発現プラスミドベクター（pCANTAB5E プラスミドベクター等）にライゲーションを行い、荷電性付与 H-N 162D 改変 Fab' 抗体発現遺伝子をを含む発現ベクターを作製した。

20

この発現ベクターを、大腸菌 HB2151 に形質転換した。上記と同様にして抗体を誘導し、ELISA によるスクリーニングをおこなった。陽性反応を示す菌からプラスミドを抽出して、大腸菌 XL10 菌へ形質転換した。形質転換された XL

25 10 菌からシーケンス反応に使用する量のプラスミドを抽出して、荷電性付与

5

10

15

20

25



同様にして、テトラメチルコーダミン-5-ヨードアセタミド（モレキュラーブロープス社製）で一分子蛍光標識した（蛍光標識して得られたものを、以下、荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体と呼ぶ場合がある）。

5 あらかじめ543nmにおけるモル吸光係数を87,000として濃度を測定した、  
蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体および荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体溶液は、それぞれ、マイクロコン-10（分画分子量10,000）（ミリポア社製）で遠心分離して濃縮後、高圧蒸気滅菌したMilliQ水を加えて遠心分離する操作を計2回繰り返して脱塩を行い、最終的に80nMとなるよう高圧蒸気滅菌したMilliQ水に溶解した。

10 ヒト アルファ1アンチトリプシン（カルビオケム社製）は高圧蒸気滅菌したMilliQ水を加えて溶解後、マイクロコン-10（分画分子量10,000）（ミリポア社製）で遠心分離して濃縮後、高圧蒸気滅菌したMilliQ水を加えて遠心分離する操作を計2回繰り返して脱塩を行い、最終的に8μMとなるよう高圧蒸気滅菌したMilliQ水に溶解した。

15 蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体溶液とヒトアルファ1アンチトリプシン溶液を等量混合し、混合溶液と等量のPhrmalyte3-10（アマシャム ファルマシアバイオテク社製、原液の20倍希釈）、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（シグマ社製、終濃度0.8%）を含む両性担体溶液を混合し、遮光化、室温にて10分間反応させ免疫複合体を形成させた。荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化  
20 F a b' 抗体溶液に関しても、同様にして反応を行い免疫複合体を形成させた。得られた反応溶液を、それぞれ、ベックマン社製キャピラリー電気泳動装置P/ACE5510を用いて分離・検出を行った。

25 蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体を用いた場合の結果を図5に示し、荷電性が付与された蛍光標識等電点均一化F a b' 抗体を用いた場合の結果を図6に示す。図5においては、移動時間が約22分の大きなピークが、20分～25分の範囲における多くのピークと重なり合っているために、十分な分離ができていな

いのに対して、図6においては、移動時間が22分付近の大きなピークと、移動時間が24分より大きい領域に現われたピークが十分分離されている。

以上説明した本発明の抗原の定量的検出方法を、等電点均一化F a b' 抗体を製造する工程を含めて模式的に表すと図7A～Dのようになる。図7Aは等電点均一化F a b' 抗体を発現する遺伝子を組み込んだ大腸菌を示し、この大腸菌に対してIPTG (isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside) を作用させることにより抗体を誘導する。図7Bは、この抗体誘導により生じた本発明の等電点均一化F a b' 抗体を示す。この等電点均一化F a b' 抗体は、アフィニティカラム等で精製した後、蛍光標識される。図7Cは、この蛍光標識された等電点均一化F a b' 抗体を示す。蛍光標識された等電点均一化F a b' 抗体と抗原とからなる免疫複合体を電気泳動した結果、図7Dに示すような移動時間と蛍光強度の関係図が得られる。

一方、特表平8-506182号公報に開示の従来技術による抗原の定量的検出方法を、等電点均一化F a b' 抗体を製造する工程を含めて模式的に表すと図8A～Gのようになる。図7A～Dと図8A～Gを比較して明らかなように、従来技術の検出方法は、等電点均一化F a b' 抗体を得るまでの工程が非常に多く煩雑であることがわかる。これに加えて、上述したように従来技術の検出方法では、測定対象である抗原の等電点と等電点均一化F a b' 抗体の等電点が近い場合、電気泳動の結果、免疫複合体と、余剰の抗原および／または等電点均一化F a b' 抗体がほぼ等しい移動時間で検出されるために、ピークが重なってしまい精度の高い検出ができない。一方、図7A～Dに示す本発明の検出方法は、等電点均一化F a b' 抗体を得るまでの工程が簡潔であり、測定対象である抗原の等電点と等電点均一化F a b' 抗体の等電点が近い場合であっても、ピークを分離して検出することができるため高精度な検出が可能となる。

産業上の利用可能性

以上説明したように、本発明によれば、測定対象である抗原の等電点と蛍光標識された抗体の等電点が近い場合であっても、高精度で抗原を分析することが可能な、抗原の定量的検出方法を提供することが可能となる。

## 請求の範囲

1. 荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、発蛍光団色素で標識されており、且つ分析用試料に含まれる抗原と免疫複合体を形成する等電点均一化 F a b' 抗体を提供する第 1 の工程と、
- 5 前記等電点均一化 F a b' 抗体と、前記抗原を含む前記分析用試料とを混合し、前記免疫複合体を含む混合物を得る第 2 の工程と、
- 前記混合物を担体中で電気泳動させ、前記混合物を分離させる第 3 の工程と、
- 前記第 3 の工程で分離された前記混合物に、前記発蛍光団色素を励起可能な励起光を照射して、前記免疫複合体に蛍光を生じせしめる第 4 の工程と、
- 10 前記蛍光を検出する第 5 の工程と、
- を含む、抗原の定量的検出方法。
2. 前記アミノ酸配列が、前記等電点均一化 F a b' 抗体の L 鎖の C 末端に隣接するように付加されている、請求の範囲第 1 項記載の方法。
- 15 3. 前記発蛍光団色素が、前記等電点均一化 F a b' 抗体の C H 1 領域の C 末端に隣接するアミノ酸配列における L 鎖との結合に関与しないシステイン残基に結合している、請求の範囲第 1 項記載の方法。
4. 前記電気泳動が、等電点電気泳動法により実施される、請求の範囲第 1 項記載の方法。
- 20 5. 前記電気泳動が、キャピラリー電気泳動法により実施される、請求の範囲第 1 項記載の方法。
6. 前記等電点均一化 F a b' 抗体が、
- F a b' 抗体の V H 領域、C H 1 領域、および該 C H 1 領域の C 末端に隣接し L 鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする F d 鎖遺伝子を提供する第 1 の工程と、
- 25 前記 F d 鎖遺伝子において、前記 C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコ

ードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変F d鎖遺伝子を得る第2の工程と、

5 前記改変F d鎖遺伝子と、前記F a b' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る第3の工程と、

前記改変F a b' 抗体発現遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子を得る第4の工程と、

10 前記荷電性付与改変F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH 1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化F a b' 抗体を得る第5の工程と、

15 前記第5の工程で得られた等電点均一化F a b' 抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第6の工程と、を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第1項記載の方法。

7. 前記等電点均一化F a b' 抗体が、

20 F a b' 抗体のVH領域、CH 1領域、および該CH 1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするF d鎖遺伝子を提供する第1の工程と、

前記F d鎖遺伝子において、前記CH 1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変F d鎖遺伝子を得る第2  
25 の工程と、

前記F a b' 抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子を提供する第3の工程と、

前記L鎖遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与L鎖遺伝子を得る第4の工程と

5 前記改変Fd鎖遺伝子と、前記荷電性付与L鎖遺伝子が発現可能な状態で連結させ、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第5の工程と、

前記荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化Fab'抗体を得る第6の工程と、

10 前記第6の工程で得られた等電点均一化Fab'抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第7の工程と、  
を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第1項記載の方法。

8. 前記等電点均一化Fab'抗体が、

15 Fab'抗体のVH領域、CH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするFd鎖遺伝子と、該Fab'抗体のL鎖をコードするL鎖遺伝子とを提供する第1の工程と、

20 前記Fd鎖遺伝子と前記L鎖遺伝子とを発現可能な状態で連結させ、Fab'抗体発現遺伝子を得る第2の工程と、

前記Fab'抗体発現遺伝子を、前記L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、且つ、前記Fab'抗体発現遺伝子における前記CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、荷電性付与改変Fab'抗体発現遺伝子を得る第3の工程と、

前記荷電性付与改変 F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つ C H 1 領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b' 抗体を得る第4の工程と、

前記第4の工程で得られた等電点均一化 F a b' 抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に発蛍光団色素を結合させる第5の工程と、を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第1項記載の方法。

9. 前記等電点均一化 F a b' 抗体が、

第1の F a b' 抗体の C H 1 領域、および該 C H 1 領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードする C H 1 遺伝子と、該第1の F a b' 抗体の C L 領域をコードする C L 遺伝子とを提供する第1の工程と、

前記 C H 1 遺伝子において、C H 1 領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変 C H 1 遺伝子を得る第2の工程と、

前記改変 C H 1 遺伝子を制限酵素で切断し C H 1 領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る第3の工程と、

第2の F a b' 抗体の V H 領域をコードする V H 遺伝子と、該第2の F a b' 抗体の V L 領域をコードする V L 遺伝子を提供する第4の工程と、

前記遺伝子断片、前記 C L 遺伝子、前記 V H 遺伝子および前記 V L 遺伝子を発現可能な状態で連結し、改変 F a b' 抗体発現遺伝子を得る第5の工程と、

前記改変 F a b' 抗体発現遺伝子を、前記 C L 領域のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与改変 F a b' 抗体発現遺伝子を得る第6の工程と、

前記荷電性付与改変 F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b' 抗体を得る第7の工程と、

前記第7の工程で得られた等電点均一化 F a b' 抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に蛍光団色素を結合させる第8の工程と、を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第1項記載の方法。

10. 前記等電点均一化 F a b' 抗体が、

10 第1の F a b' 抗体のCH1領域、および該CH1領域のC末端に隣接しL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列をコードするCH1遺伝子と、該第1の F a b' 抗体のCL領域をコードするCL遺伝子とを提供する第1の工程と、

15 前記CH1遺伝子において、CH1領域のアミド基含有アミノ酸残基をコードするコドンの少なくとも一つを、システインを除くアミド基非含有アミノ酸残基をコードするコドンに部位特異的変異させて、改変CH1遺伝子を得る第2の工程と、

前記改変CH1遺伝子を制限酵素で切断しCH1領域をコードする遺伝子を含む遺伝子断片を得る第3の工程と、

20 前記CL遺伝子を、前記CL領域のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が発現するように改変し、荷電性付与CL遺伝子を得る第4の工程と、

第2の F a b' 抗体のVH領域をコードするVH遺伝子と、該第2の F a b' 抗体のVL領域をコードするVL遺伝子を提供する第5の工程と、

25 前記遺伝子断片、前記荷電性付与CL遺伝子、前記VH遺伝子および前記VL遺伝子を発現可能な状態で連結し、荷電性付与改変 F a b' 抗体発現遺伝子を得

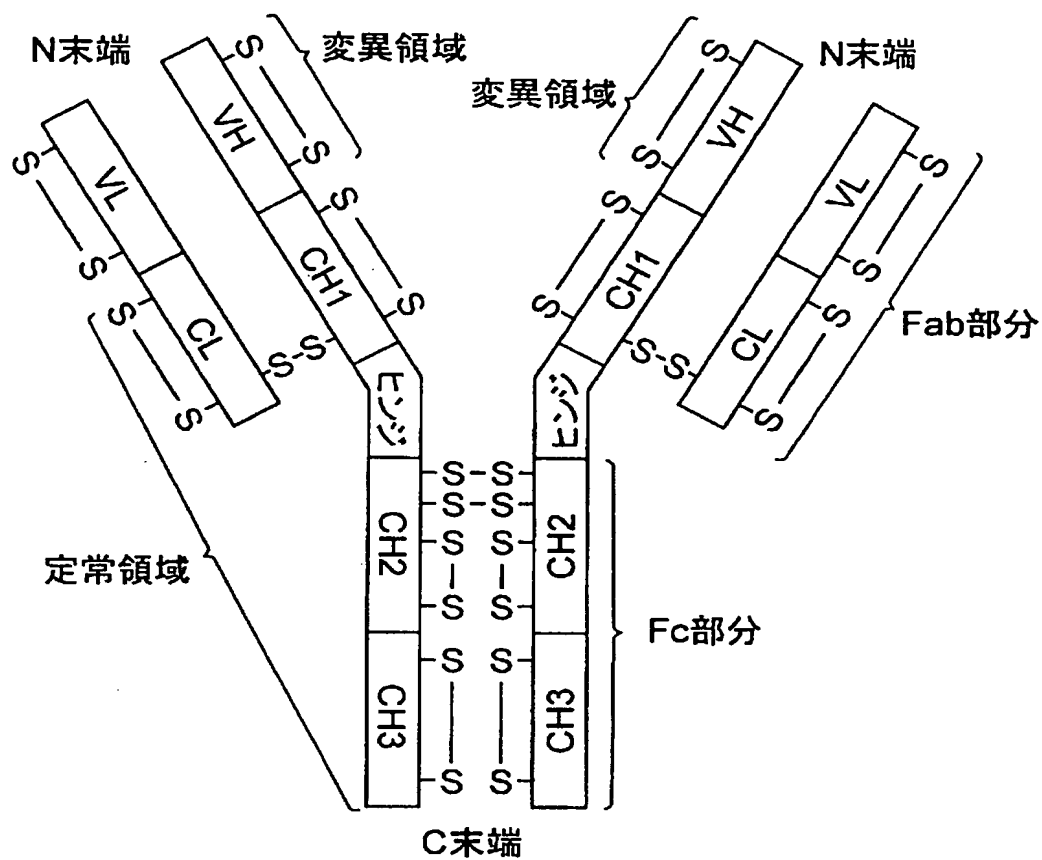


る第6の工程と、

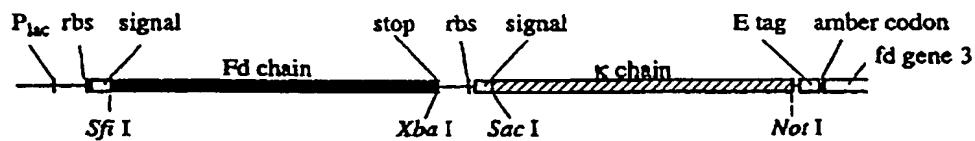
前記荷電性付与改変 F a b' 抗体発現遺伝子で宿主細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養することにより、L鎖のC末端に隣接して荷電性アミノ酸残基を含むアミノ酸配列が付加され、且つCH1領域のC末端に隣接してL鎖との結合に関与しないシステイン残基を含むアミノ酸配列が形成された、等電点均一化 F a b' 抗体を得る第7の工程と、

前記第7の工程で得られた等電点均一化 F a b' 抗体におけるL鎖との結合に関与しないシステイン残基に蛍光団色素を結合させる第8の工程と、  
を含む方法により製造されたものである、請求の範囲第1項記載の方法。

図1



2A



2B

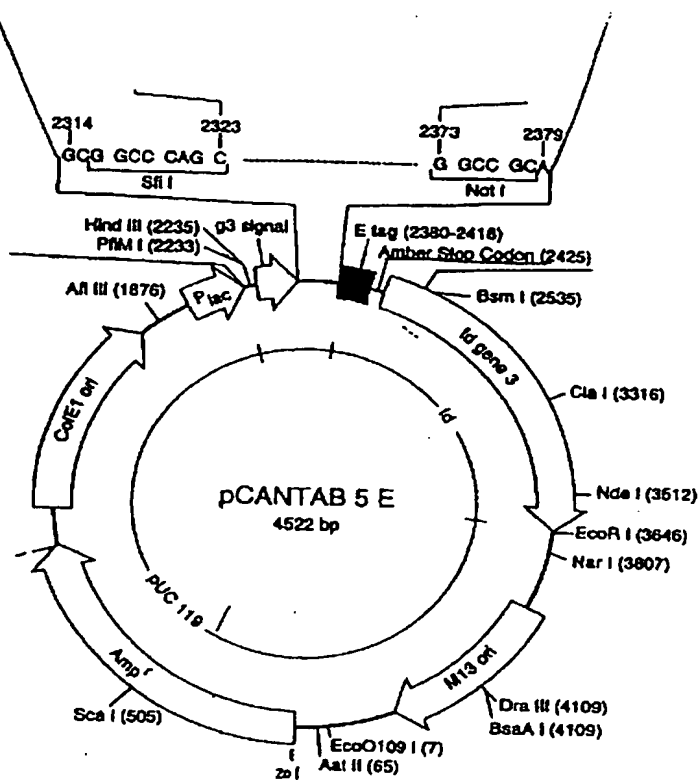


図3

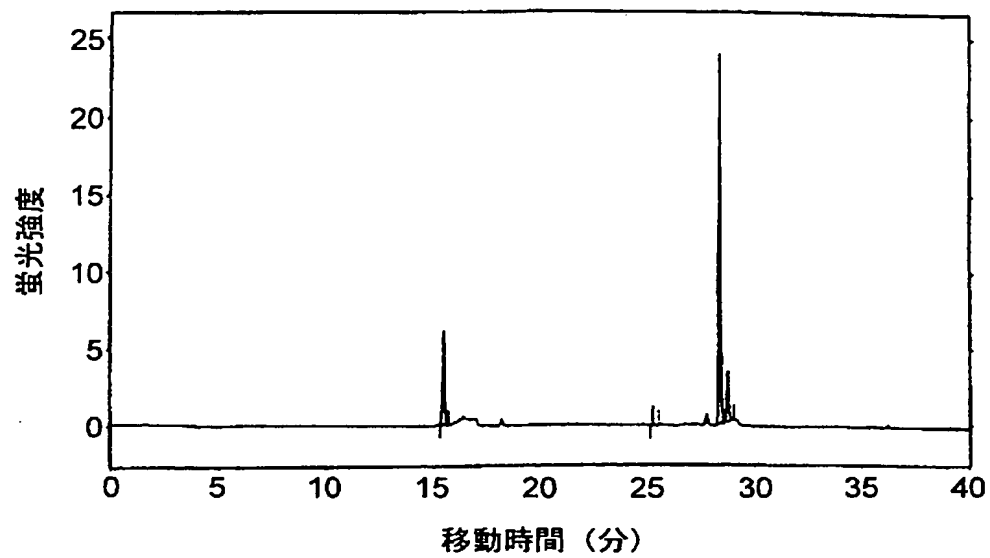


図4

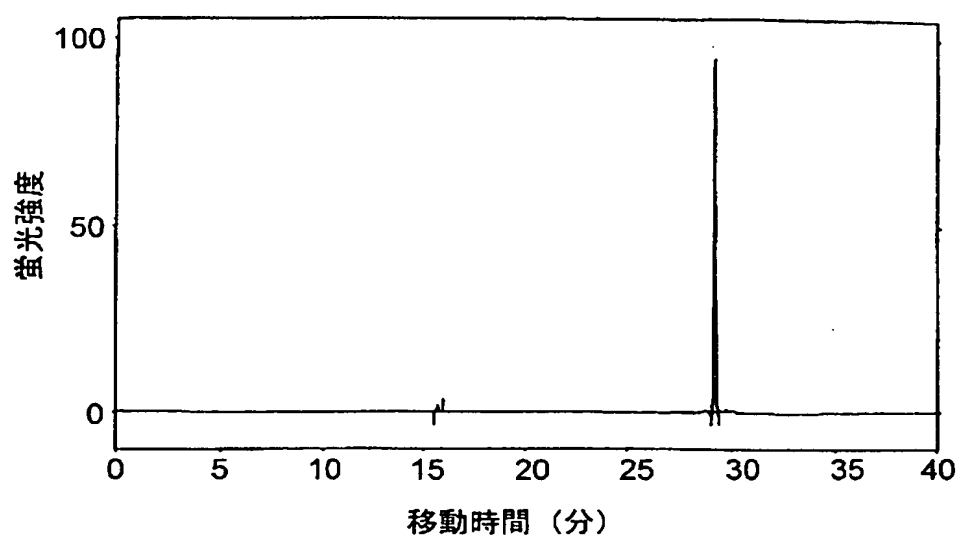


図5

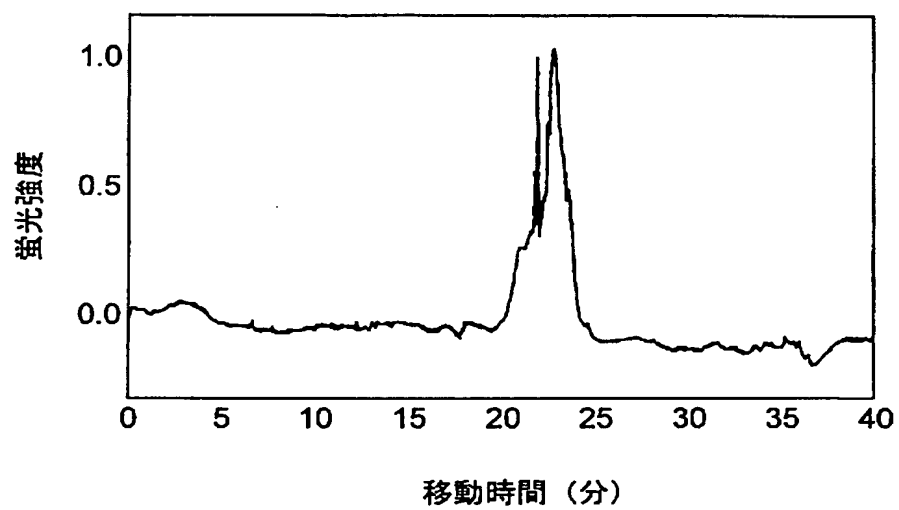


図6

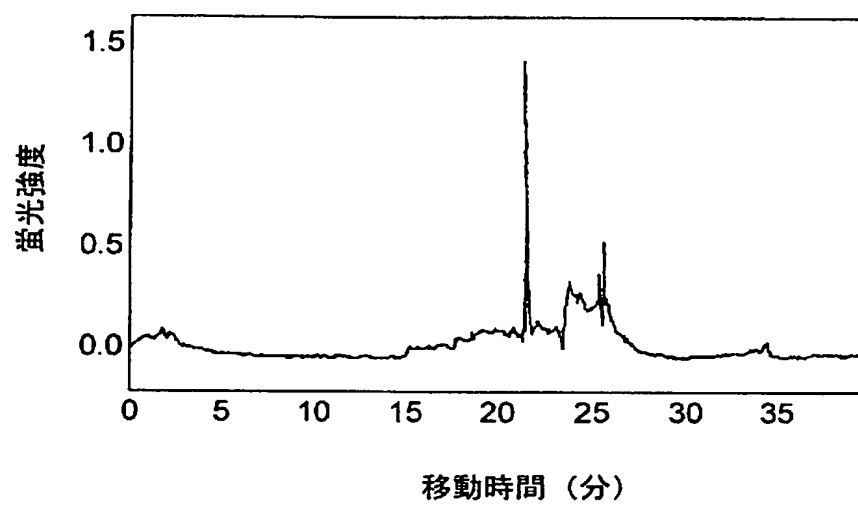


図7A



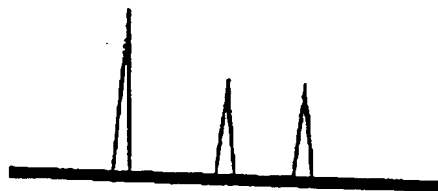
図7B



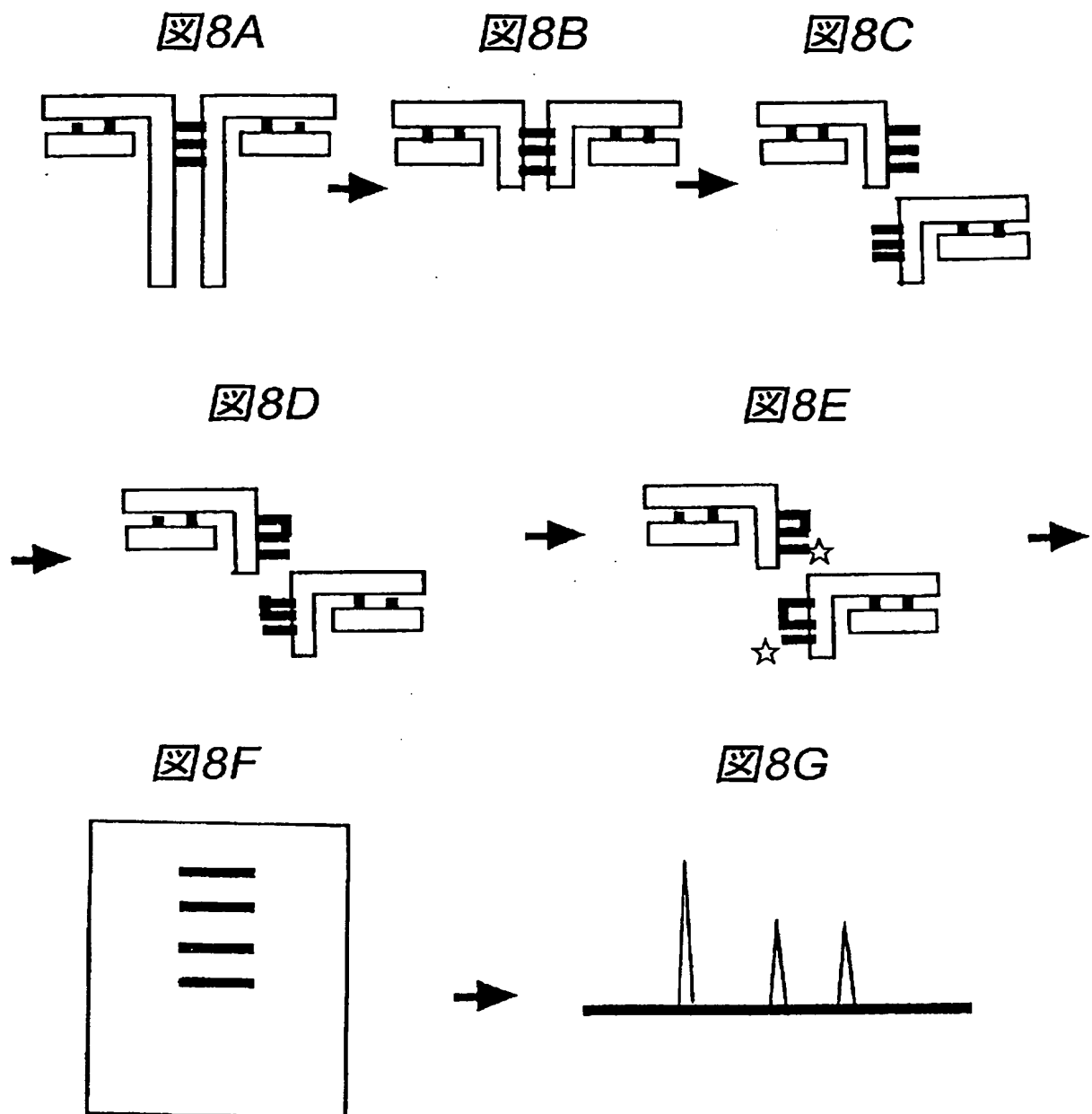
図7C



図7D







配列表

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Laboratory of Molecular Biophotonics

5

&lt;120&gt; Method for quantitative detection of antigen

&lt;130&gt; FP00-0008-00

10

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 13

15

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

20

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

25

&lt;400&gt; 1

saggtsmarc tgcagsagtc wgg

23

<210> 2

<211> 34

5 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

10

<400> 2

gcgtcatcta gaacaaccac aatccctggg caca

34

15 <210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20 <220>

<223> Primer

<400> 3

ccagwtsyga gctcswbnts acncagnmdy ch

32

25

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5

<220>

<223> Primer

<400> 4

10 acactcattc ctgttgaagc t

21

<210> 5

<211> 23

15 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

20

<400> 5

saggtsmarc tgcagsagtc wgg

23

25 <210> 6

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Primer

<400> 6

gctggacagg gatccagagt cccaggtcac tgt

33

10

<210> 7

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

<223> Primer

<400> 7

20 catgtgaact gactggggccc agccggccat ggccgaggtc cagctgcagc agtcagg 57

<210> 8

<211> 48

25 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

5 &lt;400&gt; 8

ccacgattct gcggccgcac actcattcct gttgaagctc ttgtaat 48

&lt;210&gt; 9

10 &lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

&lt;400&gt; 9

15 Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala

1 5 10 15

Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr

20 25 30

20

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asp Ser Gly Ser Leu Ser Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu

25 50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val  
65 70 75 80

5 Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys  
85 90 95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Ser Arg  
100 105

10

<210> 10  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mouse

15

<400> 10  
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala  
1 5 10 15

20 Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr  
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser  
35 40 45

25

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu

50

55

60

Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val

65

70

75

80

5

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys

85

90

95

Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Ser Arg

10

100

105

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 86

15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Primer

20

&lt;400&gt; 11

ggtgatcggc ccccgaggcc ggtctacttg gtcgacttgg tcgactaggt ctagaaggac 60

gtgaacactc attcctgttg aagctc

86

25

&lt;210&gt; 12



&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mouse

5 &lt;400&gt; 12

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln

1 5 10 15

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr

10 20 25 30

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln

35 40 45

15 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg

65 70 75 80

20

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro

85 90 95

Ile Thr Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys Ser Arg Pro Ser Arg Pro

25 100 105 110

Ser Arg Pro Ser Arg Pro Ser Arg Pro

115

120

5 <210> 13  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> Mouse

10 <400> 13  
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln  
1 5 10 15

15 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr  
20 25 30

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln  
35 40 45

20 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr  
50 55 60

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg  
65 70 75 80

25 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro

WO 01/61351

PCT/JP00/00903

85

90

95

Ile Thr Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys

100

105

5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00903

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/533, G01N33/561, G01N33/563		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> G01N33/533, G01N33/561, G01N33/563, C12N15/13, C07K16/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS (DIALOG) WPIL (DIALOG)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	JP, 8-506182, A (Northeastern University), 02 July, 1996 (02.07.96), Full text & WO, 94/17419, A & US, 5348633, A & AU, 9461625, A & EP, 680608, A	1, 2, 4, 5 3, 6-10
Y A	JP, 5-322892, A (John Krupi), 07 December, 1993 (07.12.93), Full text & US, 5019521, A & EP, 447133, A & DE, 69120700, E	1, 2, 4, 5 3, 6-10
Y A	JP, 7-222597, A (Genentech, Inc.), 22 August, 1995 (22.08.95), Claims & EP, 125023, A & US, 4816567, A & DE, 3484664, G	1, 2, 4, 5 3, 6-10
Y A	JP, 11-127855, A (JAPAN ENERGY CORPORATION), 18 May, 1999 (18.05.99), Claims (Family: none)	1, 2, 4, 5 3, 6-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 March, 2000 (28.03.00)		Date of mailing of the international search report 11 April, 2000 (11.04.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/00903

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/533, G01N33/561, G01N33/563

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' G01N33/533, G01N33/561, G01N33/563, C12N15/13, C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年

日本国公開実用新案公報 1971-2000年

日本国登録実用新案公報 1994-2000年

日本国実用新案登録公報 1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG)

WPIL(DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP, 8-506182, A(ノースイースタン ユニバーシティ) 2. 7月. 1996(0 2. 07. 96) 全文&WO, 94/17419, A&US, 5348633, A&AU, 9461625, A &EP, 680608A	1, 2, 4, 5 3, 6-10
Y A	JP, 5-322892, A(ジョン・クルービー) 7. 12月. 1993(07. 12. 93) 全文&US, 5019521, A&EP, 447133, A&DE, 69120700, E	1, 2, 4, 5 3, 6-10
Y A	JP, 7-222597, A(ジェネンテック・インコーポレイテッド) 22. 8月. 199 5(22. 08. 95) 特許請求の範囲&EP, 125023, A&US, 4816567, A&DE, 3484664, G	1, 2, 4, 5 3, 6-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

28. 03. 00

国際調査報告の発送日

11.04.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

山村 様子

2J

9217

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y A	JP, 11-127855, A (株式会社ジャパンエナジー) 18. 5月1999 (18. 05. 99) 特許請求の範囲 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 5 3, 6-10